

# ZEITSCHRIFT FÜR BIOLOGIE

*Unter Mitarbeit von*

E. Bauereisen, Leipzig - R. Dittler, Marburg/Lahn - A. Jarisch, Innsbruck - L. Lendle,  
Göttingen - H. Lieb, Graz - H. Lullies, Kiel - R. Rigler, Graz - H. Schaefer, Heidelberg  
F. Scheminzky, Innsbruck - H. Schriever, Mainz - G. Schubert, Wien - E. Schüg, Münster/W.  
H. Weber, Heidelberg - K. Wezler, Frankfurt/Main - E. Wöhlisch, Würzburg

*herausgegeben von*

A. W. FORST - B. ROMEIS - R. WAGNER

109. Band · Heft 2



Urban & Schwarzenberg · München · Berlin · Wien 1957



# Inhalt

## *Aus dem Physiologischen Institut der Universität München*

- Dr. Wilhelm Becker, Statistische Untersuchungen der Pupillenweiten in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Mit 1 Abbildung . . . . . 81

## *Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg*

- Dr. Heinz Schröer, Über das Verhalten des Fibrinogens bei der Papierelektrophorese des Plasmas. 2. Mitteilung. Mit 3 Abbildungen . . . . . 86

## *Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München*

- Dr. Wolfgang Felix und Dr. Friedrich-Wilhelm Bremer, Über den mechanischen Einfluß der Kontraktion auf die Durchblutung des Skelettmuskels. Mit 5 Abbildungen . . . . . 102

## *Aus dem Oto-Rhino-Laryngologischen Institut der Universität Hiroshima*

- Dr. T. Yamashita, Über den Statolithen in den Sinneskörpern der Meduse Aurelia aurita. Mit 5 Abbildungen . . . . . 111

- Das Aktionspotential der Sinneskörper (Randkörper) der Meduse Aurelia aurita. Mit 3 Abbildungen . . . . . 116

## *Aus dem Physiologischen Institut der Universität Münster/Westf.*

- Prof. Dr. K.E. Rothschild, Über sich fortpflanzende Kontraktionen an Skelettmuskelfasern unter dem Einfluß von Monojodessigsäure-NaCN-Gemischen. Mit 3 Abbildungen . . . . . 123

## *Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München*

- Dr. Albert Herz, Über die Verminderung des kritischen Hämolysevolumens von Pferdeerythrocyten durch Gerbstoffe. Mit 8 Abbildungen. . . . . 129

## *Aus dem Physiologischen Institut der Universität Jena*

- Prof. Dr. Friedrich Schwarz, Über eine neue Methode der heterochromen Photometrie. Mit 3 Abbildungen . . . . . 142

## *Aus dem Zoologischen Institut der Universität Köln*

- Dr. Georges Thines und Dr. Joachim Kähling, Untersuchungen über die Farbempfindlichkeit des Höhlenfisches Anoptichthys jordani Hubbs und Innes (Characidae). Mit 3 Abbildungen . . . . . 150

---

**Schriftleitung:** Prof. B. Romeis, Institut für Histologie und experimentelle Biologie, München 15, Pettenkoferstr. 11, Ruf 54 0 84.

Manuskripte sind zu schicken:

von Arbeiten experimentell-biologischen Inhalts an Prof. Benno Romeis, Institut für Histologie und experimentelle Biologie, München 15, Pettenkoferstr. 11, Ruf 54 0 84, von Arbeiten physiologischen und physiologisch-chemischen Inhalts an Prof. Richard Wagner, Physiologisches Institut, München 15, Pettenkoferstr. 12, Ruf 53 3 35, 51 5 46, von Arbeiten pharmakologischen Inhalts an Prof. August Wilhelm Forst, Pharmakologisches Institut, München 15, Nußbaumstr. 28, Ruf 51 0 34.

**Erscheinungsweise:** Die Zeitschrift erscheint in Heften von etwa 5 Druckbogen; je 6 Hefte bilden einen Band.

**Bezugspreis:** Der Preis beträgt für ständige Bezieher je Heft DM 12.50 und je Band DM 75.—. Einzelpreis des Heftes DM 14.—. Einbanddecken DM 3.— je Band.

**Anzeigen:** Aufträge an den Verlag Urban & Schwarzenberg, München 26, Thierschstraße 11, erbeten.

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München  
(Direktor: Professor Dr. R. Wagner)

## Statistische Untersuchungen der Pupillenweiten in Abhängigkeit von der Lichtintensität

Von W. Becker

Mit 1 Abbildung

Eingegangen am 17. Mai 1956

Im Laufe der in der vorausgehenden Arbeit von *Bleichert* und *Wagner* beschriebenen Versuche ergab sich die Notwendigkeit, die Meßergebnisse einer statistischen Analyse zu unterziehen. Dabei sollten sowohl die individuelle Streuung der Pupillendurchmesser als auch die Streuung der bei sämtlichen Versuchspersonen gewonnenen Meßwerte untersucht werden.

### Methodik

Die individuelle Streuung wurde bei drei verschiedenen Lichtintensitäten geprüft, nämlich bei 6,67, 0,28 und 0,13 lx. Diese Intensitäten entsprechen markanten Punkten der in der Arbeit von *Bleichert* und *Wagner* gezeigten Kurve (Abb. 2: Pupillenfläche als Funktion der Lichtintensität). Zahl der Versuchspersonen und Anzahl der Meßwerte s. Ergebnisse.

Die Streuung des Kollektivs wurde an 13 Versuchspersonen bei sämtlichen von *Bleichert* und *Wagner* untersuchten Lichtintensitäten bestimmt. Bei den Versuchspersonen handelt es sich ausschließlich um Studenten (12 männlich, 1 weiblich) zwischen 20 und 28 Jahren.

Die hier verwandte Methode ist die in der Arbeit von *Bleichert* und *Wagner* geschilderte photographische Messung der Pupillenweite nach 15 Minuten Dunkeladaptation und 4 Sekunden Prüflichteinwirkung. Alle Versuche wurden am Nachmittag durchgeführt. Die Versuchspersonen durften vor und während der Versuche nicht rauchen.

### Statistische Untersuchungen der Pupillenweiten in Abhängigkeit von der Lichtintensität

Im folgenden bedeuten:

- $x$  = die beobachteten Werte (mm)
- $N$  = Umfang der Verteilung
- $s$  = Variationsbreite ( $x_n - x_1$ , mm)
- $d$  = Klassengröße (mm)
- $M$  = Arithmetischer Mittelwert (mm)



$\sigma$  = Mittlere quadratische Abweichung oder Streuung

$$\left( \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n z_i (x_i - M)^2}{n-1}} \right), \text{ mm}$$

$z$  = Häufigkeit der in einer Verteilung  $N$  auftretenden gleichen  $x$ -Werte

$Z$  = Zentralwert (derjenige Wert, der die Beobachtungsreihe halbiert, mm)

$D$  = Dichtemittel (derjenige Wert, der in einer Beobachtungsreihe verhältnis-

mäßig am häufigsten vorkommt,  $x_g + \frac{(n_0 - n_{-1})}{2n_0 - n_{-1} - n_{+1}} \cdot d$ , mm)

$x_g$  = den zur untersten Grenze der am stärksten besetzten Klasse gehörenden Argumentwert

$n_0$  = die Häufigkeit derselben

$n_{-1}$  = die Häufigkeit der beiden Nachbarklassen  
 $n_{+1}$

$S$  = Schiefeit  $\left( \frac{M - D}{\sigma} \right)$

### Ergebnisse

#### 1. Die individuelle Streuung der Pupillendurchmesser für gleiche Lichtintensitäten

Mit der Prüflichtintensität von 0,28 lx wurden bei einer Versuchsperson (Be) 184 Aufnahmen gemacht und die Ergebnisse zur Feststellung der individuellen Streuung statistisch untersucht.

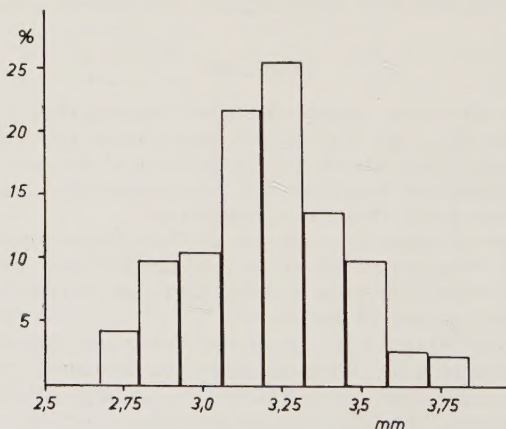


Abb. 1. Häufigkeitspolygon zu Tab. 1. 184 Messungen an einer Versuchsperson bei 0,28 lx.

Tabelle 1 gibt die Zahlen der statistischen Auswertung wieder.

Abb. 1 zeigt das zur Tabelle 1 gehörige Häufigkeitspolygon. Es handelt sich dabei um eine geringfügige rechtsseitige Asymmetrie, da  $M < Z < D$  (siehe E. Weber).

Zum Vergleich seien noch Versuche mit geringem Umfang, ebenfalls bei 0,28 lx und zwei weiteren Lichtintensitäten angeführt, mit insgesamt drei Versuchspersonen (Tabelle 2).

Tabelle 1

$d = 0,13$	$z$	$\sigma/\sigma_0$	
2,67—2,79	8	4,4	
2,80—2,92	18	9,8	$N = 184$
2,93—3,05	19	10,3	$s = 1,08$
3,06—3,18	40	21,7	$M = 3,20$
3,19—3,31	47	25,5	$Z = 3,205$
3,32—3,44	25	13,6	$D = 3,23$
3,45—3,57	18	9,8	$S = -0,12$
3,58—3,70	5	2,7	$\sigma = 0,243$
3,71—3,83	4	2,2	

Tabelle 2

Prüflichtintensität 0,28 lx:

Pa: $N = 9$	Ja: $N = 20$
$s = 0,47$	$s = 0,43$
$M = 3,02$	$M = 3,13$
$Z = 3,06$	$Z = 3,23$
$\sigma = 0,146$	$\sigma = 0,085$

Prüflichtintensität 6,67 lx:

Be: $N = 10$	Pa: $N = 10$	Ja: $N = 10$
$s = 0,10$	$s = 0,29$	$s = 0,18$
$M = 2,65$	$M = 2,80$	$M = 2,65$
$Z = 2,65$	$Z = 2,79$	$Z = 2,68$
$\sigma = 0,045$	$\sigma = 0,090$	$\sigma = 0,064$

Prüflichtintensität 0,13 lx:

Be: $N = 20$	Pa: $N = 10$	Ja: $N = 10$
$s = 0,59$	$s = 0,32$	$s = 0,62$
$M = 4,97$	$M = 4,22$	$M = 4,29$
$Z = 5,01$	$Z = 4,23$	$Z = 4,40$
$\sigma = 0,225$	$\sigma = 0,083$	$\sigma = 0,200$

## 2. Die Streuung unseres Gesamtmaterials an Versuchspersonen in der Reihenfolge fallender Intensitäten des Prüflichtes

Die folgenden Ergebnisse stammen von 13 Versuchspersonen, deren Pupillen in einem Versuchsgang bei verschiedener Prüflichtintensität 11 mal photographiert wurden. Sie stellen wegen der geringen Zahl der Versuchspersonen und wegen der verschiedenen Anzahl der Versuche für jede Versuchsperson (zwischen 2—6 Versuche), nur einen groben Anhalt für die tatsächliche Variabilität dar. Der Versuch erlaubt einen Vergleich über den Gang der Streuung bei verschiedenen Lichtintensitäten, ohne eine Aussage über die absolute Größe der Streuung bei einem ausreichend großen Versuchspersonenkollektiv zuzulassen.

Tabelle 3

6,67 lx:	3,17 lx:	0,92 lx:	0,44 lx:
$N = 27$	$N = 43$	$N = 43$	$N = 40$
$s = 1,18$	$s = 1,65$	$s = 1,98$	$s = 2,17$
$M = 2,75$	$M = 2,73$	$M = 2,96$	$M = 3,17$
$Z = 2,85$	$Z = 2,95$	$Z = 3,11$	$Z = 3,53$
$\sigma = 0,284$	$\sigma = 0,382$	$\sigma = 0,447$	$\sigma = 0,528$
0,28 lx:	0,13 lx:	0,093 lx:	0,018 lx:
$N = 42$	$N = 41$	$N = 42$	$N = 41$
$s = 2,18$	$s = 2,11$	$s = 2,11$	$s = 2,10$
$M = 3,35$	$M = 3,60$	$M = 4,20$	$M = 4,44$
$Z = 3,68$	$Z = 3,74$	$Z = 4,36$	$Z = 4,66$
$\sigma = 0,605$	$\sigma = 0,612$	$\sigma = 0,592$	$\sigma = 0,549$
0,012 lx:	0,0056 lx:	0,000 lx:	
$N = 42$	$N = 42$	$N = 42$	
$s = 2,19$	$s = 1,84$	$s = 1,25$	
$M = 4,68$	$M = 4,79$	$M = 5,62$	
$Z = 4,87$	$Z = 4,97$	$Z = 5,88$	
$\sigma = 0,612$	$\sigma = 0,523$	$\sigma = 0,350$	

## Diskussion

Wie aus Tab. 1 ersichtlich, beträgt die Schiefeit  $S$  des Häufigkeitspolygons  $-0,12$ . Dies ist für eine biologische Beobachtungsreihe gering. Es ist durchaus möglich, daß bei einer größeren Beobachtungsreihe die Werte  $M$ ,  $D$  und  $Z$  zusammenfallen, so daß man von einer symmetrischen Verteilung sprechen könnte.

Wir haben unter 13 Versuchspersonen diejenigen mit der größten Streuung ausgesucht. Es ist daher zu erwarten, daß die Streuungen bei anderen Versuchspersonen im Durchschnitt unter dem von uns angegebenen Wert liegen.

Die Streuung ist mit  $0,243$  relativ gering, wenn man bedenkt, daß die Iris als vegetativ innerviertes Organ außer von der Licht- und Konvergenzreaktion (die in unseren Versuchen konstant auf etwa  $3 D$  gehalten wurde) von dem jeweiligen Kräfteverhältnis im vegetativen Nervensystem abhängt.

Die Streuungen in Tabelle 2 sind durchweg kleiner, was sicher zum Teil auf dem geringeren Umfang der Beobachtungsreihen beruht.

Aus Tabelle 3 ist zu ersehen, daß die Streuung mit fallender Prüflichtintensität größer wird, bei  $0,13 lx$  ein erstes und bei  $0,012 lx$  ein zweites Maximum erreicht, um bei dem vorletzten Wert und völliger Dunkelheit wieder stark abzusinken. Die Streuung der Extremwerte ( $6,67 lx$  und  $0 lx$ ) gibt einen Anhalt für die individuelle Streuung der extremen Pupillenweite. Bei den dazwischenliegenden Werten kommt noch die Streuung der Reaktionsweise dazu.

Die beiden Punkte maximaler Streuung entsprechen den beiden Knickpunkten der Kurven (vgl. Abb. 2 der genannten Arbeit Bleichert und



Wagner). Zwischen beiden liegt der steilste Kurvenast. Da die Lage dieser Knickpunkte in der Kurve individuell etwas verschieden ist und die Steilheit der Kurven zwischen diesen Punkten ebenfalls individuell variiert, ist die große Streuung innerhalb der Extremwerte ohne weiteres verständlich.

#### *Zusammenfassung*

Mit einer von A. Bleichert und R. Wagner angegebenen Methode wurde die Streuung der Pupillenweite unter definierten Bedingungen statistisch untersucht. Für eine einzelne Versuchsperson konnte bei einer bestimmten Lichtintensität die Verteilung der Werte durch ein Häufigkeitspolygon wiedergegeben werden. Außerdem waren für mehrere Versuchspersonen Angaben über die Streuung des Kollektivs bei einer Reihe verschiedener Lichtintensitäten möglich.

#### *Summary*

According to the method described by A. Bleichert and R. Wagner the seize of the pupils is investigated under defined conditions; an analysis of variance has been performed. The distribution of the values has been shown by a frequency polygon for a single test person exposed to a controlled light intensity. Also, for several test persons exposed to different light intensities the data of the standard deviation of the pupil seize are given.

#### *Résumé*

Avec la méthode indiquée par A. Bleichert et R. Wagner on étudie statistiquement et dans des conditions définies le champ de variation de la largeur de la pupille. Pour une seule personne, on a pu traduire la répartition des valeurs avec une intensité lumineuse donnée, grâce à un polygone de fréquence. En outre, on a pu établir, pour plusieurs personnes, des données concernant les variations du collectif au cours d'une série d'intensités lumineuses diverses.

#### **Schrifttum**

Bleichert, A. u. R. Wagner, Zschr. Biol. **109** (1956): 70 — Weber, E., Grundriß der biologischen Statistik, Jena 1948

*Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Wöhlisch)*

## **Über das Verhalten des Fibrinogens bei der Papierelektrophorese des Plasmas**

**(2. Mitteilung)**

*Von Heinz Schröer*

Mit 3 Abbildungen

Eingegangen am 4. Juni 1956

### *Einleitung*

In einer früheren Mitteilung<sup>13</sup> wurde über Versuche berichtet, die auf ein verschiedenartiges Verhalten des Fibrinogens bei der Papierelektrophorese (P. E.) des Plasmas hinweisen: Im Pherogramm frischen Oxalat- oder Zitratplasmas tritt das Fibrinogen bei Verwendung allgemein gebräuchlicher Filtrierpapiersorten sowie eines Veronalnatrium-Natriumazetat-Puffers vom pH 8,6 und der Ionenstärke  $\mu = 0,1$  hinter den  $\gamma$ -Globulinen als „Nachfraktion“ auf, während es in gealtertem und in heparinhaltigem Oxalatplasma ebenso wie in reiner Lösung als  $\varphi$ -Komponente wandert. Durch die mitgeteilten Versuche war die Frage noch nicht entschieden worden, ob es sich bei dem Substrat der „Nachfraktion“ um Fibrinogen oder um sein Umwandlungsprodukt Fibrin handelt, weswegen der unterschiedliche Ausfall der Plasma-P. E. grundsätzlich zwei Deutungen zuließ: Handelte es sich um Fibrinogen, so blieb auf Grund der bisherigen Ergebnisse nur noch die Annahme übrig, daß dieses in frischem Plasma in anderer Form vorläge als in gealtertem Plasma, in Heparinplasma oder in reiner Lösung. War das fragliche Substrat aber Fibrin, so mußte ein bei der P. E. von Plasma in Erscheinung tretender fibrinoplastischer Effekt der Papierfaser oder der Elektrophoresebedingungen angenommen werden.

Im Verlauf der nachfolgend beschriebenen Versuche wurde die „Nachfraktion“ als Fibrin erkannt. Damit erhob sich die Frage nach den Bedingungen, unter denen eine Fibrinbildung, also eine Gerinnung des Plasma-Fibrinogens, während der P. E. zustande kommt.



### Methodik

P. E., Plasmagewinnung und Bestimmung von Gerinnungszeiten erfolgten in der früher (1. Mitteilung) beschriebenen Weise. Zur P. E. nach der Methode von Grassmann und Hannig wurde, wenn im Text nicht ausdrücklich anders vermerkt, Filtrierpapier Schleicher & Schüll 2043 a sowie Veronalnatrium-Natriumazetat-Puffer (pH 8,6, Ionenstärke  $\mu = 0,1$ ) benutzt. Die papierelektrophoretisch zu untersuchende Lösung wurde auch bei den folgend aufgeführten Versuchen stets erst nach 2—3 stündiger „Leer“-Elektrophorese der Papierstreifen aufgetragen. Das zur Äther- und Tetrachlorkohlenstoff-Verdampfung benutzte Feinvakuum (ca.  $2 \cdot 10^{-2}$  Torr) wurde mittels Leybold-Gasballastpumpe, Modell D 10, erzeugt.

#### Verwendete Substanzen und Lösungen:

1. Fibrinogen-Behringwerke: Röhrchen mit je 60 mg Trockenfibrinogen. Zur Herstellung der verwendeten Lösungen wurde der Inhalt eines Röhrchens in 4 cm<sup>3</sup> physiologischer Kochsalzlösung gelöst.
2. Topostasin-Hoffmann-La Roche: Originalfläschchen mit je 3000 NIH-Einh. kristallisierten Thrombins.
3. Heparin-Nordmarkwerke: Heparin-Natrium in Substanz, 110 Einh./mg.
4. Thrombokinasen: a) Ampullen mit je 80 mg getrockneten Kaninchenhirns (Behringwerke), gelöst nach den Angaben der Behringwerke. b) Kaninchenhirnextrakt eigener Herstellung.
5. m/40 Calciumchlorid, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung.
6. Faktor V (Accelerin) und Faktor VII (Convertin): Gereinigte und standardisierte Präparate, je 1 mg lyophil getrockneter Substanz pro Ampulle (Behringwerke).
7. 10 %ige Lecithinsuspension in physiologischer Kochsalzlösung (Lecithin ex ovo puriss., Merck).
8. Trockengift der vipera Russellii (Behringwerke): Das Gift kam 0,02 %ig, in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, zur Anwendung.
9. Bariumsulfat, reinst (Merck).
10. Dextrin, rein (Merck).

Unter dem im Text gebrauchten Ausdruck „frisches Plasma“ ist ein Oxalatplasma zu verstehen, dessen Pherogramm — entsprechend den Ausführungen im 1. Beitrag zum Thema der Überschrift — eine „Nachfraktion“ aufweist. Dies ist bei den verschiedenen Tierplasmen verschieden lange der Fall; im Kühlschrank aufbewahrtes Menschen-Oxalatplasma ist in diesem Sinne während 2—3 Tagen nach der Blutentnahme frisch. Entsprechend wird unter „gealtertem“ oder „gelagertem Plasma“ ein Oxalatplasma verstanden, das bei der P. E. keine „Nachfraktion“ mehr erkennen läßt.

### V Versuchsergebnisse

1. Zur Frage der Wanderung der „Nachfraktion“ während der P. E.

Die folgenden Versuche sollten aufklären, ob das Wandern der „Nachfraktion“ im elektrischen Feld als Kataphoreseeffekt im eigentlichen Sinne anzusehen sei, oder ob für ihre Fortbewegung auf dem Papier Begleiterscheinungen der P. E. (Dochteffekt, Elektroosmose) verantwortlich gemacht werden müßten.

#### a) Vergleich mit ungeladener Indikatorsubstanz.

Dextrin, das in hochkonzentrierter Lösung als ungeladene Indikatorsubstanz<sup>19</sup> verwendet wurde, wanderte nach Auftragung auf den kathodennahe gelegenen Startstrich des Papierstreifens während 12-stündiger P. E. etwas weiter in Richtung zur Streifenmitte als die „Nachfraktion“

eines unter gleichen Bedingungen aufgetrennten frischen Plasmas. Nach anodennahem Start bewegte sich das Dextrin in Richtung zur Kathode. Die hierbei durchwanderte Strecke betrug etwa das Doppelte des Weges, den das Dextrin nach kathodennaher Auftragung in Richtung zur Anode zurückgelegt hatte, während im Pherogramm eines anodisch aufgetragenen Plasmas die „Nachfraktion“ in unmittelbarer Nähe des Startstrichs — weniger deutlich als nach kathodennaher Auftragung — in Erscheinung trat. Waren die Substanzen in der Streifenmitte aufgetragen worden, so zeigte sich nach der P. E. des Dextrins zwischen Startlinie und kathodennaher gelegener Dextrinbande etwa der gleiche Abstand, wie er nach kathodennaher Auftragung zwischen dem Startstrich und der anodennaher gelegenen Bande beobachtet worden war. Dagegen erschien die „Nachfraktion“ des in Streifenmitte gestarteten Plasmas entweder auf dem Startstrich selbst oder dicht neben diesem auf der Anodenhälfte des Streifens.

Aus diesem Verhalten ging hervor, 1. daß der Stoff der „Nachfraktion“ in geringerem Maße als das ungeladene Dextrin von dem durch Evaporation verursachten Flüssigkeitsstrom mitbewegt wurde, 2. daß der Einfluß der Elektroosmose, der sich bei der P. E. von Dextrin dem der Evaporation addiert, für eine Fortbewegung der „Nachfraktion“ nicht bzw. nur von geringer Bedeutung sein konnte, 3. daß die beiden bezüglich ihrer Wanderung miteinander verglichenen Substrate sich unter gleichen Bedingungen nicht streng gleichsinnig verhielten, womit ein Hinweis auf eine Beteiligung der Elektrophoresebedingungen an der Entstehung der „Nachfraktion“ gegeben war. Außerdem sprachen die Versuchsergebnisse für eine beträchtliche Teilchengröße und eine fehlende oder sehr schwache Ladung der Bande. Letzteres gab, auch im Hinblick auf die Lage des durch Quellung bestimmten isoelektrischen Punktes des Fibrins ( $\simeq$  pH 6) (Wöhlisch<sup>17b</sup>), eine gewisse Berechtigung, das Substrat als Fibrin anzusehen.

Die Wahrscheinlichkeit, daß der Stoff der „Nachfraktion“ ein Umwandlungsprodukt des Fibrinogens vorstellte, war durch diese Versuche größer geworden. Die Vermutung, daß es sich dabei um Fibrin handle, konnte leider nicht durch einen direkten Fibrin-Nachweis auf dem Papier bestätigt werden. Die von Diebold und Jühling<sup>4</sup> zum Nachweis von Hitzefibrin und Thrombinfibrin verwendete Nitroprussidreaktion, welche nach Hopkins<sup>5</sup> für denaturierte Proteine charakteristisch ist, erwies sich zur Anfärbung des Fibrins auf dem Papier als ebenso wenig brauchbar wie die Weigertsche Fibrinfärbung, die für den Zweck der Anfärbung auf Papier geringfügig modifiziert worden war. Auch Elutionsversuche mit dem Ziel, das vermutliche Fibrin der „Nachfraktion“ eines frischen von dem Fibrinogen der  $\varphi$ -Fraktion eines gealterten Plasmas im Gerinnungsversuch (Thrombinzusatz zu den Eluaten) voneinander zu unterscheiden, waren ohne befriedigendes Resultat. Es wurde deshalb nach einem weiteren indirekten Beleg für die Annahme gesucht, daß der fragliche Stoff Fibrin sei.

#### b) Vergleich mit gelöstem Fibrin.

Zur Herstellung einer Fibrinlösung wurden, Versuchen von Lorand<sup>7,8</sup> entsprechend, 2 cm<sup>3</sup> einer 2%igen Fibrinogenlösung durch Zusatz von 0,1 cm<sup>3</sup> einer stark verdünnten Thrombinlösung zur Gerinnung gebracht.



Das entstandene Gerinnsel blieb 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen und wurde dann mit 2,1 cm<sup>3</sup> einer 60 %igen Harnstofflösung überschichtet. Das Fibringerinnsel löste sich innerhalb von 4 Stunden vollständig auf. Nach der P. E. dieser wasserklaren Lösung von Fibrin in 30 %igem Harnstoff zeigte sich auf dem angefärbten Streifen in Startstrichnähe eine Bande, die hinsichtlich ihrer Lage und ihrer inhomogenen, streifenförmigen Struktur der „Nachfraktion“ eines Oxalatplasmas glich. Auf ihrer anodischen Seite lief die Bande in eine unregelmäßig begrenzte, homogen blaßblau angefärbte Zone aus, die wohl auf Abbauprodukte des Fibrins zurückgeht.

Fibrinogen, das zur Kontrolle des Harnstoffeinflusses ebenfalls in 30 %igem Harnstoff gelöst wurde, zeigte bei der P. E. die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie in physiologischer Kochsalzlösung gelöstes Fibrinogen, vorausgesetzt, daß die Temperatur bei der Herstellung der Lösung etwa 30° C nicht überschritt, da bei höheren Temperaturen der Harnstoff zur Denaturierung des Fibrinogens führt (Wöhlisch<sup>17 a</sup>). Wurde die Fibrinogen-Harnstofflösung im Thermostaten bei 37° C hergestellt, so war im Pherogramm die typische Fibrinogenbande restlos verschwunden. Stattdessen zeigte sich wie bei der P. E. von in Harnstoff gelöstem Fibrin die vom Startstrich anodenwärts ziehende, blaßblaue Zone mit verzierter anodischer Begrenzung. Innerhalb dieser Zone hob sich an einer dem Auftrittort der „Nachfraktion“ entsprechenden Stelle des Pherogramms eine stärker angefärbte Bande hervor.

Harnstofflösliches Fibrin sowie unter Harnstoffeinfluß denaturiertes Fibrinogen verhielten sich bei der P. E. also ähnlich wie die „Nachfraktion“ eines frischen Plasmas. In früheren Untersuchungen<sup>13</sup> war bereits festgestellt worden, daß die Bedingungen der P. E. allein — auch bei Verwendung von Plasma-Ultrafiltrat als Lösungsmittel für Fibrinogen — keine Fibrinogendenaturierung bewirken. Wenn andererseits durch die hier beschriebenen Versuche das Substrat der „Nachfraktion“ mit Wahrscheinlichkeit als ungeladenes Umwandlungsprodukt des Fibrinogens anzusehen war, so mußte an dem Zustandekommen der fraglichen Bande neben den Elektrophoresebedingungen ein nicht ultrafiltrierbarer Plasmabestandteil beteiligt sein. Es war daher zu erwarten, daß eine Fibrinogenlösung, welche diesen Plasmabestandteil enthielt, in ihrem Pherogramm eine Bande nach Art der „Nachfraktion“ aufweisen würde.

## 2. P. E. von Fibrinogenlösung nach Zusatz kleiner Plasmamengen.

Eine 1,5 %ige Fibrinogenlösung wurde mit frischem Plasma im Verhältnis 4:1 gemischt. Die Mischung blieb 15—20 min bei Zimmertemperatur stehen und wurde dann papierelektrophoretisch aufgetrennt. Das gesamte Fibrinogen der aufgetragenen Mischung fiel im Pherogramm an der Stelle der „Nachfraktion“ an (Abb. 1, b). Dieser zunächst bei Verwendung von Schweine-Oxalatplasma als Zusatzsubstrat zu Fibrinogenlösung beobachtete Effekt ließ sich auch durch Zusatz anderer frischer Tierplasmen (Kalb, Rind, Schaf, Kaninchen) sowie von Menschen-Oxalatplasma zu Fibrinogenlösung erzielen. Einzelne Pherogramme zeigten eine eigentümliche Unregelmäßigkeit; auf diesen war das Fibrinogen zum Teil als

$\varphi$ -Bande, zum Teil als „Nachfraktion“ sichtbar, woraus ein Mitwirken des Papiers bzw. der Elektrophoresebedingungen bei der Entstehung der „Nachfraktion“ klar hervorging.

Wurde einer Fibrinogenlösung gelagertes Plasma zugegeben, so wanderte das Fibrinogen dieser Mischung mit seiner normalen Geschwindigkeit. Auch nach Zusatz von heparinhaltigem frischem Oxalatplasma sowie von Plasma, das 10 min auf 56° C erhitzt worden war (Abb. 1, c), zu Fibrinogenlösung blieb im Pherogramm der Mischung die „Nachfraktion“ aus.

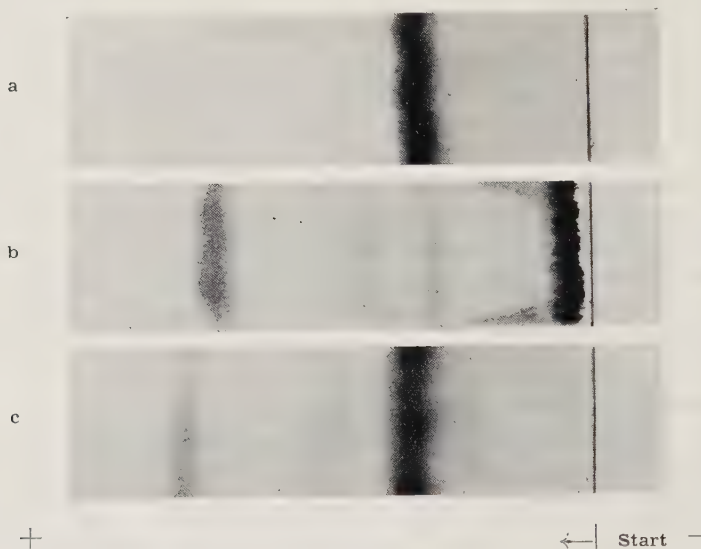


Abb. 1. Pherogramme 1,5 %iger Fibrinogenlösungen: a) Reine Lösung. Der Hauptanteil des Fibrinogens ist mit der Geschwindigkeit der  $\alpha$ -Komponente gewandert. b) Fibrinogenlösung nach Zusatz von frischem Schweine-Oxalatplasma. Das gesamte Fibrinogen der Mischung ist als „Nachfraktion“ in der Nähe der Auftragsstelle liegen geblieben. c) Fibrinogenlösung nach Zusatz eines 10 min auf 56° C erhitzten Schweine-Oxalatplasmas. Der Fibrinogenanteil der Mischung ist, wie im oberen Streifen (a), mit normaler Geschwindigkeit gewandert.

Mit Serum versetzte Fibrinogenlösungen verhielten sich ähnlich: In einzelnen Fällen erschien auch hierbei alles Fibrinogen als „Nachfraktion“. Bei der Mehrzahl der Versuche waren die erwähnten Unregelmäßigkeiten hinsichtlich der Darstellung der Bande jedoch besonders auffallend. Eine Beurteilung dieser Versuche war dadurch erschwert, daß die zur P. E. verwendeten Fibrinogen-Serum-Gemische, auch bei Benutzung gelagerten Serums, sämtlich innerhalb von 1—8 Stunden, also noch im Verlauf der P. E., gerannen.

Die Beteiligung eines nicht ultrafiltrierbaren, thermolabilen Plasmabestandteils am Zustandekommen der „Nachfraktion“ war damit erwiesen. Traf die Vermutung zu, daß der Stoff der „Nachfraktion“ Fibrin sei, so konnte der fragliche Plasmabestandteil nur ein Gerinnungsfaktor sein, der während der Plasma-Wanderung eine Bildung von Thrombin bewirkte. Dieses war in den verwendeten Seren nachweislich in geringen Mengen vorhanden, im Plasma jedoch nur in Form seiner inaktiven Vorstufe, des Prothrombins.



### 3. Einfluß von Blutgerinnungsfaktoren auf das Zustandekommen der „Nachfraktion“.

a) Prothrombin. — Frische Oxalatplasmen (Mensch, Kaninchen, Schwein) wurden durch Adsorption an Bariumsulfat prothrombinfrei gemacht. Hierzu wurden die Plasmen mit Bariumsulfat ( $50 \text{ mg/cm}^3$ ) versetzt und 20 min schonend geschüttelt. Danach wurde scharf zentrifugiert, das überstehende „Plasma“ nochmals 20 min mit Bariumsulfat geschüttelt und erneut zentrifugiert. Der nach dem 2. Zentrifugieren erhaltene Plasma-rest war als prothrombinfrei anzusehen<sup>3</sup>. Die durch Adsorption an  $\text{BaSO}_4$  außerdem bewirkte Entfernung des VII. Gerinnungsfaktors aus dem Plasma war für den folgenden Versuch nicht von Bedeutung. Zur Kontrolle ihrer Brauchbarkeit wurden die untersuchten Plasmen nach Zusatz von Lecithin und Viperngift — als hochaktivem „Thrombokinase“-Präparat<sup>10</sup> — recalcifiziert (Gerinnungsansatz:  $0,6 \text{ cm}^3$  Plasma +  $0,4 \text{ cm}^3$  physiologischer Kochsalzlösung, enthaltend 5 % Lecithin und 0,01 % Viperntoxin, +  $0,7 \text{ cm}^3$  m/40 Calciumchloridlösung). Die  $\text{BaSO}_4$ -behandelten Plasmen hatten ihre Gerinnungsfähigkeit im Recalcifizierungsversuch verloren, während die unbehandelten, mit Lecithin und Viperngift versetzten Plasmen Recalcifizierungszeiten von 12—18 sec aufwiesen. Die Thrombinzeiten der prothrombinfreien entsprachen denen der unbehandelten Plasmen, sofern die Konzentration der verwendeten Thrombinlösung auf eine Gerinnungszeit von 20 sec eingestellt worden war.

Im Pherogramm prothrombinfreier Plasmen trat eine „Nachfraktion“ nicht mehr in Erscheinung. Dagegen zeigte sich eine deutliche  $\varphi$ -Fraktion. Auch in einer Mischung aus Fibrinogenlösung und prothrombinfreiem Plasma (4:1) wanderte das Fibrinogen ausnahmslos mit der Geschwindigkeit der  $\varphi$ -Komponente.

Die Anwesenheit von Prothrombin im aufzutrennenden Plasma erwies sich somit als notwendige Voraussetzung für das Auftreten der „Nachfraktion“. — Als Fibrinogen-Umwandlungsprodukt, dessen Entstehung die Anwesenheit von Prothrombin im aufzutrennenden Plasma voraussetzte, konnte aber nur Fibrin in Frage kommen. Da die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin jedoch nicht durch Prothrombin selbst, sondern durch dessen Aktivierungsprodukt Thrombin bewirkt wird, war eine während der P.E. erfolgte Prothrombinaktivierung anzunehmen. Diese erfordert in vitro die Anwesenheit von Calciumionen und Thrombokinase. Letztere war in den verwendeten frischen Plasmen in ausreichender Menge vorhanden, wie die jeweils zur Kontrolle durchgeführten Recalcifizierungsversuche zeigten. Als Quelle für Calciumionen kam dagegen nur das zur P.E. benutzte Filtrierpapier in Frage.

b) Calciumionen. — Zur Entfernung mineralischer Verunreinigungen<sup>6</sup> wurden mehrere Papierstreifen der Sorten *Schleicher & Schüll* 2043 a und *Whatman*-Nr. 1 24 Stunden mit n/10 Salzsäure behandelt, anschließend während 48 Stunden in destilliertem Wasser, das mehrmals gewechselt wurde, gewaschen und danach bei  $60^\circ \text{C}$  getrocknet. Bei Verwendung der säuregewaschenen Streifen zur P.E. frischer Plasmen blieb im Pherogramm die „Nachfraktion“ aus. Zum Beweis, daß der Effekt auf das Fehlen von Calcium — und nicht auf die Anwesenheit anderer mineralischer Verunreinigungen — zurückzuführen war, wurden

einige der säuregewaschenen, getrockneten Papierstreifen  $1\frac{1}{2}$  Stunde in einer m/40 Calciumchloridlösung gebadet, mit destilliertem Wasser abgespült und getrocknet. Auf diesem recalcifizierten Papier kam die „Nachfraktion“ nach der P. E. frischer Plasmen wieder deutlich zum Vorschein.

#### c) Faktor V und Faktor VII.

Es lag nahe, das Ausbleiben des Gerinnungseffektes bei der P. E. gelagerten Plasmas auf das Fehlen des V. Gerinnungsfaktors bzw. dessen Vorstufe, des Proaccelerins (*Quicks labile factor*), zurückzuführen, welches im Verlauf der Plasmalagerung bekanntlich verhältnismäßig schnell zerstört wird.

Als proaccelerinhaltiges Substrat diente zunächst  $\text{BaSO}_4$ -behandeltes frisches Schweine-Oxalatplasma (der Proacceleriergehalt beträgt nach der Adsorption noch etwa 50—70 %<sup>3</sup>). Dieses wurde gelagertem, also prothrombinhaltigem, Plasma im Verhältnis 1:1 zugegeben und das Gemisch sofort zur P. E. angesetzt. Das Pherogramm ließ gelegentlich, jedoch nicht regelmäßig, eine schwache „Nachfraktion“ erkennen. Dagegen war nach Zusatz eines Reinpräparates von Accelerin, also aktivem Faktor V, zu gelagertem Plasma selbst bei der größten technisch erreichbaren Konzentration (verwendete Endkonzentrationen von Faktor V in Plasma: 0,1, 1,0, 10, 30, 100 und 600 mg %) in keinem Falle das Auftreten einer „Nachfraktion“ im Pherogramm zu beobachten. Das gleiche negative Ergebnis hatten Versuche, bei denen gelagertem Plasma außer Accelerin Convertin als aktives, gereinigtes Faktor-VII-Präparat im gleichen Mengenverhältnis zugesetzt worden war.

Das uneinheitliche Ergebnis dieser und anderer, hier nicht aufgeführter Versuche ließ eine klare Deutung nicht zu; eine Erklärung für das Fehlen der „Nachfraktion“ in gealtertem Plasma ist daher noch nicht zu geben. Es hat aber den Anschein, als sei der Befund mit einer Inaktivierung bzw. Zerstörung des Proaccelerins während der Plasmalagerung allein nicht hinreichend zu begründen. Jeder Versuch einer Erklärung wird zudem durch die bestehenden Verschiedenheiten der Auffassungen bezüglich der Wirkung des V. und VII. Gerinnungsfaktors erschwert.

#### 4. Einfluß des elektrischen Feldes auf die Aktivierung des Prothrombins bei der Plasma-P. E.

Nach den bisher beschriebenen Versuchsergebnissen stand fest, daß während der P. E. frischen Oxalatplasmas unter den gegebenen Bedingungen eine Gerinnung erfolgte, die zum Auftreten einer Fibrinbande („Nachfraktion“) im Pherogramm führte. Die Versuche sagten aber noch nichts darüber aus, ob die für den Gerinnungseintritt notwendige Prothrombinaktivierung allein einer recalcifizierenden Wirkung des Papiers zuzuschreiben sei; denn der Gerinnungseffekt war bisher stets nur unter Elektrophoresebedingungen, also bei Anliegen eines elektrischen Spannungsgefälles, beobachtet worden. Wenn die Fibrinbande lediglich das Ergebnis eines ungewöhnlich modifizierten Recalcifizierungsversuchs vorstellte, so war sie auch dann zu erwarten, wenn frisches Plasma ohne Anliegen einer Spannung unter sonst gleichen Bedingungen die Länge des Papiers durchwanderte.

Um frisches Oxalatplasma ohne die Einwirkung einer elektrischen Potentialdifferenz über Filtrierpapier *Schleicher & Schüll* 2043 a wandern zu



lassen, wurde das Plasma in der feuchten Kammer der Apparatur von *Grassmann* und *Hannig* „durchlaufchromatographiert“. Die Vorbereitung des Papiers erfolgte in der gleichen Weise wie zur P. E.: Nach gründlicher Anfeuchtung mit Pufferlösung wurden die Streifen auf ihre Rahmen gespannt und bereits 2—3 Stunden vor Versuchsbeginn in die feuchte Kammer gebracht. Das Niveau der Pufferlösung in den beiden Wannen war anfangs gleich hoch. Eine elektrische Spannung lag während des eigentlichen Versuchs nicht an. Ob für die Dauer der Streifen-Vorbereitung zusätzlich eine Spannung angelegt wurde oder nicht, erwies sich im Vorversuch für das Ergebnis als belanglos, womit der mögliche Einfluß einer Calciumionen-Anreicherung am Kathodenende des Streifens hinsichtlich der folgenden Befunde untergeordnete Bedeutung annahm.

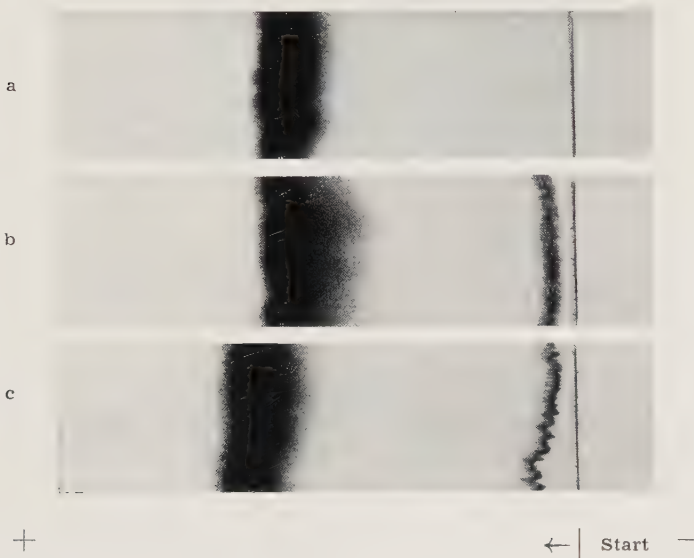


Abb. 2. Durchlaufchromatogramme (s. Text) von frischem Schweine-Oxalatplasma: a) Ohne Spannungseinwirkung. Glatte Wanderung der gesamten Plasmamasse. b) Nach anfänglicher 2-stündiger Einwirkung einer Spannung von 90 V. Auftreten einer charakteristischen Fibrinbande in der Nähe der Auftragsstelle. c) Nach anfänglicher 15 min langer Einwirkung einer Spannung von 90 V. In Startstrichnähe zeigt sich eine verzerrte, aber deutliche Fibrinbande.

Zu Versuchsbeginn wurde  $0,01 \text{ cm}^3$  frisches Plasmas in der gewohnten Weise auf einen seitlich gelegenen Startstrich aufgetragen, anschließend die Pufferlösung aus dem vom Startstrich am weitesten entfernten Elektrolytgefäß abgesaugt und die Kammer wieder geschlossen. Während 12-stündigem Durchlauf nach dem Heberprinzip wanderte das Plasma um etwa 6—8 cm mit der mobilen Phase. — Die in 21 Einzelversuchen auf diese Weise mit verschiedenen Tier- und Menschenplasmen erhaltenen „Durchlaufchromatogramme“ ließen weder eine Fibrinbande noch sonst ein Anzeichen für eine während der Wanderung des Plasmas erfolgte Gerinnung erkennen (Abb. 2, a). Durchlaufchromatogramme, die mit Serum erhalten worden waren, unterschieden sich nicht von den mit Plasma

erhaltenen. Ebenso wanderte eine im Verhältnis 4:1 mit frischem Plasma versetzte Fibrinogenlösung einheitlich.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Methoden der Papierchromatographie und der Papierelektrophorese miteinander kombiniert: Nach Auftragung des Plasmas wurde 2 Stunden lang Gleichspannung (90 V) angelegt, danach die Spannung abgenommen und das eine Elektrolytgefäß entleert. Die Versuchsdauer betrug auch hierbei insgesamt 12 Stunden. Die entwickelten Streifen zeigten außer der erwähnten Verlagerung der Plasmaposition sämtlich in Startstrichnähe eine Bande, an deren Identität mit der Fibrinbande eines Plasma-Pherogramms nicht zu zweifeln war (Abb. 2, b).

Die Zeit der Spannungseinwirkung vor Beginn der Durchlaufchromatographie wurde in weiteren Versuchen schrittweise verkürzt auf: 1 Std., 45 min, 30 min, 15 min, 5 min, 1 min, 15 sec. Bei Verwendung frischer Plasmen trat die Fibrinbande nach anfänglicher Spannungseinwirkung von 30-minütiger oder längerer Dauer regelmäßig auf. Bei Anwendung kürzerer Zeiten stellten sich Unregelmäßigkeiten ein: Die Fibrinbande trat entweder gar nicht auf, oder ihr Aussehen war eigentümlich verzerrt (Abb. 2, c). Es zeigte sich ferner, daß die zur Erzielung des Effektes notwendige Mindestdauer der Spannungseinwirkung in stärkerem Maße als das Auftreten der Fibrinbande in einem normalen Plasma-Pherogramm von dem Alter des untersuchten Plasmas abhängig war. So konnte bei Verwendung eines bereits 60 min nach der Blutentnahme aufgetragenen Schweine-Oxalatplasmas eine verzerrte Fibrinbande nach einer anfänglichen Spannungseinwirkung von nur 15 sec Dauer festgestellt werden, während dasselbe Plasma auf Kontrollstreifen unter rein durchlaufchromatographischen Bedingungen keine Fibrinbande lieferte.

Zur Ermittlung des Mindestpotentials, unter dessen Einwirkung eine Fibrinbande noch auftrat, wurden nunmehr Spannungen von 10 V und 0,6 V (gemessen an den Papierenden) zu Beginn des Versuches für die Dauer von 60 min angelegt. In beiden Fällen trat eine Fibrinbande auf. Eine Spannung von 0,2 V war ohne eine entsprechende Wirkung.

Die während der P. E. frischen Plasmas stattfindende Gerinnung konnte nach diesen Versuchen kaum noch allein als Folge einer recalcifizierenden Papierwirkung angesehen werden. Vielmehr mußte die zur Auslösung der Gerinnung erforderliche Prothrombinaktivierung primär dem Einfluß der angelegten elektrischen Potentialdifferenz zugeschrieben werden. Zu dieser Aktivierung reichte bei frischem Schweineplasma als Substrat die einstündige Einwirkung einer elektrischen Feldstärke von nur 24 mV/cm (entsprechend 0,6 V der angelegten Spannung bei 25 cm Streifenlänge) aus.

##### 5. P. E. lipoidextrahierter Plasmen.

An dieser Stelle sei kurz über einen Befund aus einer noch nicht abgeschlossenen Versuchsreihe berichtet, die zur Klärung der Frage durchgeführt wird, welche Bedeutung der Thrombokinasen bei dem während der Plasma-P. E. sich abspielenden Gerinnungsvorgang zukommt.

Frisches Schweine-Oxalatplasma wurde im Verhältnis 1:1 mit Tetra-chlorkohlentoff 48 Stunden auf der Schüttelmaschine (Frequenz: 1,5/sec) geschüttelt. Danach blieb das Extraktionsgemisch 15 Stunden bei 4° C im



Scheidetrichter stehen. Die überstehende milchig-trübe „Plasma“-Schicht wurde dekantiert, mit 1/10 vol Äther versetzt und 5 min leicht durchmischt. Das hierbei sich bildende Magma ließ sich durch 2-stündiges Zentrifugieren bei 1800 g vom Plasmarest trennen. Dieser wurde abpipettiert und im Vakuum von restlichem Äther und Tetrachlorkohlenstoff befreit. Das so erhaltene lipoidextrahierte Plasma, in welchem der Lipoidanteil der Thrombokinas fehlte, hatte seine Gerinnungsfähigkeit verloren (s. Tabelle 1, erste Spalte). In seinem Pherogramm trat jedoch über-

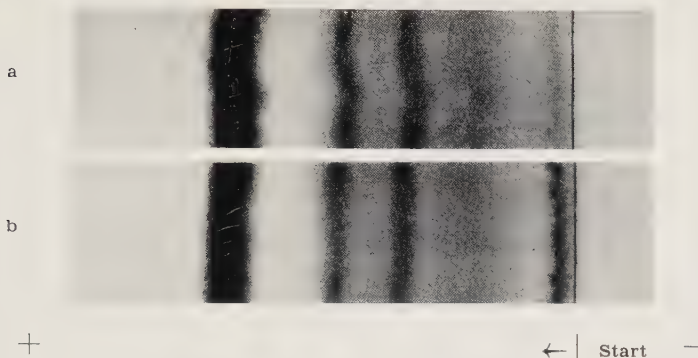


Abb. 3. a) Pherogramm eines 48 Stunden mit Tetrachlorkohlenstoff extrahierten Schweine-Oxalatplasmas. Schwache Fibrinbande neben der Auftragsstelle; leicht verstärkte Anfärbung der Strecke zwischen Fibrin- und  $\gamma$ -Bande. b) Dasselbe nach Zusatz von Viperngift zum extrahierten Plasma. Intensive Fibrinbande, die sich von der vorauswandernden  $\gamma$ -Bande klar absetzt.

raschend eine — gegenüber der „Nachfraktion“ des unbehandelten Plasmas allerdings abgeschwächte — Fibrinbande in Erscheinung (Abb. 3, a). Zusatz von Viperntoxin, das in vitro die Gerinnungsfähigkeit nicht wiederherzustellen vermag (s. Tabelle 1, dritte Spalte)<sup>10</sup>, verstärkte die Fibrinbande (Abb. 3, b). Auch Lecithinzusatz (s. Tabelle 1, zweite Spalte) sowie vor allem gleichzeitige Zugabe beider Substanzen (s. Tabelle 1, vierte Spalte) zum extrahierten Plasma förderten das Auftreten der Banden im Pherogramm.

Der Versuch ist angeführt worden, weil er zeigt, daß die Anwesenheit des vollständigen Thrombokinasekomplexes im papierelektrophoretisch untersuchten Plasma nicht unbedingt Voraussetzung für den beschriebenen Gerinnungseffekt ist. Es scheint vielmehr, als könne die Rolle der entfernten Lipide von dem angelegten Potentialgefälle übernommen werden.

Die Versuchsergebnisse lassen sich wie folgt kurz zusammenfassen:

1. Das Substrat der „Nachfraktion“ eines frischen Oxalat- oder Zitratplasmas weist eine hohe Teilchengröße auf und trägt wahrscheinlich keinen oder nur einen geringen Ladungsüberschuß. In Harnstoff gelöstes Fibrin zeigt im Pherogramm eine der „Nachfraktion“ entsprechende Bande.
2. Das Fibrinogen einer Fibrinogenlösung, die kleine Zusätze frischen Plasmas enthält, bleibt bei der P.E. an der Stelle der „Nachfraktion“ liegen. Nach Zusatz von Heparinplasma, gelagertem Plasma, auf 56° C erhitztem sowie BaSO<sub>4</sub>-behandeltem Plasma zu Fibrinogenlösung tritt dieser Effekt nicht auf.

Tabelle 1

**Vergleich der Recalcifizierungszeiten (Rec.Zeit)**  
**eines tetrachlorkohlenstoffextrahierten Schweine-Oxalatplasmas ( $\text{CCl}_4$ -Pl) mit**  
**denen desselben, aber nicht behandelten Plasmas (Pl); ohne Zusatz und nach**  
**Zusatz von Lecithin und Viperngift.**

Plasmasorte (je 0,4 cm <sup>3</sup> )	0,9 %ige NaCl-Lösung (cm <sup>3</sup> )	10 %ige Lecithin- Suspension (cm <sup>3</sup> )	0,02 %ige Viperntoxin- Lösung (cm <sup>3</sup> )	m/40 CaCl <sub>2</sub> - Lösg. (cm <sup>3</sup> )	Rec. Zeit (12-stündige Beobachtung) (sec)
Pl	0,2	—	—	0,7	210
$\text{CCl}_4$ -Pl	"	—	—	"	$\infty$
Pl	0,12	0,08	—	0,7	200
$\text{CCl}_4$ -Pl	"	"	—	"	980
Pl	0,18	—	0,02	0,7	52
$\text{CCl}_4$ -Pl	"	—	"	"	$\infty$
Pl	0,1	0,08	0,02	0,7	16
$\text{CCl}_4$ -Pl	"	"	"	"	35

3. Im Pherogramm prothrombinfreien frischen Oxalatplasmas sowie bei Verwendung weitgehend calciumfrei gemachten Papiers zur P. E. erscheint das Fibrinogen an typischer Stelle als  $\varphi$ -Bande. Der Proacceleriergehalt eines Plasmas ist allein wahrscheinlich nicht entscheidend für das unterschiedliche papierelektrophoretische Verhalten des Fibrinogens in frischem und gelager-tem Plasma.
4. Beim Wandern von Plasma auf dem zur P. E. verwendeten Filtrierpapier nach Art eines Durchlaufchromatogramms bleibt der Gerinnungseffekt aus. Kurzzeitige Einwirkung einer elektrischen Potentialdifferenz vor Beginn der „Durchlaufchromatographie“ führt zum Auftreten einer Fibrinbande („Nachfraktion“) in Startstrichnähe. Die hierzu notwendige Mindestzeit der Spannungseinwirkung wird mit zunehmender Plasmaalterung länger.
5. In  $\text{CCl}_4$ -extrahiertem Plasma tritt im Verlauf der P. E. eine Fibrinbande auf. Zusätze von Lecithin und Viperngift zu diesem Plasmarest fördern das Auftreten der Bande.

### *Besprechung der Versuchsergebnisse*

Die Untersuchungen, über die in dieser und in der vorigen Mitteilung berichtet wurde, nahmen ihren Ausgang von einer bei der Papierelektrophorese frischen Oxalat- oder Zitratplasmas zu beobachtenden Störung: Bedient man sich zur Plasma-P. E. der allgemein üblichen Methodik, so sind die erhaltenen Pherogramme nicht auswertbar, weil in ihnen der Bereich der  $\gamma$ -Globulinbande zum Teil von einer mit Amidoschwarz gut anfärbbaren Substanz ungleichmäßig durchsetzt ist. Die Tatsache, daß in solchen Pherogrammen das Fibrinogen nicht an typischer Stelle zwi-



schen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulinen erscheint, wo es nach dem Ergebnis elektrophoretischer Plasma-Auftrennungen im *Tiselius*-Verfahren zu erwarten wäre, hat offenbar dazu geführt, daß man die störende, ungleichmäßig wandernde Substanz als Fibrinogen ansah und glaubte, die Ursache der Störung in dem hohen Teilchengewicht und der Molekülgestalt des Fibrinogens bzw. seiner hierdurch bedingten geringen Beweglichkeit im Papier erblicken zu müssen<sup>1, 18, 19</sup>.

Führt man die Plasma-P. E. erst nach einer vorbereitenden 2—3-stündigen „Leer“-Elektrophorese<sup>13</sup> der Papierstreifen durch, so gelingt es, die störende Substanz zwischen  $\gamma$ -Bande und Startlinie in Form einer relativ scharf abgegrenzten Bande zu sammeln, wodurch der Störeffekt einer Untersuchung leichter zugänglich wird. Bei dem Substrat der Bande handelt es sich weder um feinste Eiweißausfällungen von Stoffen der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Fraktion<sup>16</sup>, noch um unverändertes Fibrinogen. Die Bande ist vielmehr das Ergebnis einer im Beginn der Plasma-P. E. sich abspielenden Gerinnung; ihr Substrat muß als Fibrin angesprochen werden. Kunstgriffe, die den Gerinnungsvorgang bei der P. E. verhindern, bilden daher grundsätzlich die Basis für eine brauchbare papierelektrophoretische Auftrennung von frischem Plasma. Als solche kommen zur Zeit in Betracht: 1. Verwendung von Heparinplasma anstelle von Oxalat- oder Zitratplasma (*Scheiffarth* und Mitarb.<sup>12</sup>), 2. Verwendung calciumfreien Filtrierpapiers, 3. Verwendung von prothrombinfreiem Plasma, 4. Verwendung eines Phosphatpuffers vom pH 9,2 (*Berkeš* und *Karas*<sup>2</sup> \*). Bei Anwendung eines dieser Kunstgriffe wandert das Fibrinogen mit der Geschwindigkeit der  $\varphi$ -Komponente des Plasmas. Es hinterläßt, wie *Scheiffarth* und Mitarbeiter in vergleichenden Untersuchungen mit Serum-Elektrophoresen zeigen konnten, auch keine Wanderungsspur, die bei der Auswertung des Plasma-Pherogramms einen Zuwachs der  $\gamma$ -Fraktion vortäuschen könnte. Entsprechendes gilt für die Wanderung reinen gelösten Fibrinogens; eine Wanderungsspur tritt hierbei zwar in Erscheinung, sie ist jedoch kaum stärker als die eines papierchromatographisch gewanderten Serums und dürfte demnach als Störung im vertretbaren Bereich der mit der P. E. verbundenen Fehlerquellen liegen. Es ist somit auch nicht möglich, dem Fibrinogen bezüglich seines papierelektrophoretischen Verhaltens auf Grund seiner Molekülgröße und -gestalt eine Sonderstellung unter den Plasmaproteinen einzuräumen.

Die hier mitgeteilten Versuche geben nicht nur die Erklärung für die Schwierigkeiten, welche der normalen Plasma-P. E. im Wege stehen, sondern sie bringen auch Befunde, die gerinnungsphysiologisch von Interesse sind. Es zeigte sich, daß der Gerinnungseintritt während der P. E. nicht mit einer unmittelbaren Einwirkung des Papiers oder der Elektrophoresebedingungen auf das Fibrinogen und allem Anschein nach auch nicht allein mit einer Recalcifizierung des aufgetragenen Plasmas erklärt werden kann. Die Anwesenheit von Calcium im verwendeten Filtrierpapier erweist sich

\* Mit steigendem pH-Wert wird die Plasmagerinnung zunehmend erschwert; bei pH-Werten über 10,2 tritt in vitro keine Gerinnung mehr ein. Für die Brauchbarkeit der Methode dürfte dieser Zusammenhang mitbestimmend sein.

zwar als Voraussetzung für den Eintritt der Gerinnung, aber der Calciumgehalt des Papiers ist, wie die „durchlaufchromatographischen“ Untersuchungen zeigen, offenbar zu klein, um gerinnungsauslösend im Sinne einer Recalcifizierung wirken zu können. Ausgelöst wird die Gerinnung vielmehr durch die bei der P. E. wirksam werdende elektrische Potentialdifferenz. Die Fibrinbildung während der P. E. ist andererseits, den Verhältnissen in vivo und in vitro entsprechend, nur bei Anwesenheit von Prothrombin im aufzutrennenden Plasma bzw. Fibrinogen-Plasma-Gemisch zu beobachten, woraus auf eine unter den Bedingungen der P. E. erfolgende Aktivierung des Prothrombins zu schließen ist. Als Bedingungen der P. E. sind im einzelnen anzusehen: die Einflüsse des Filtrierpapiers, des angelegten Potentialgefälles und der verwendeten Pufferlösung. Der Einfluß des Puffers braucht in diesem Zusammenhang nicht näher besprochen zu werden. Das Papier dürfte in zweifacher Hinsicht wirksam werden: 1. als benetzbare Oberfläche und 2. als Calcium-Träger. Da sich die Calciumkonzentration aber als unzureichend für eine Prothrombinaktivierung erweist, scheint diese primär auf den Einfluß des angelegten elektrischen Spannungsgefälles zurückzuführen zu sein.

In einer Arbeit von *Schultze* und *Schwick*<sup>14</sup> über den Mechanismus der Thrombinbildung im isolierten System, in welcher die Autoren u. a. die Anwesenheit von Heparin in Prothrombin und Thrombin bzw. eine geringgradige „papierelektrophoretische Dissoziation des Prothrombins in Thrombin und Heparin“ nachweisen zu können glauben, findet sich folgender Nebenbefund: Die eluierten Proteinbestandteile einer mittels P. E. (auf *Whatman*-Nr. 1 -Papier) aufgetrennten hochgereinigten 10 %igen Prothrombinlösung bewirkten eine spontane Gerinnung des zur Testung benutzten Plasmas. Die Autoren gehen auf diesen Befund nicht näher ein und stellen nur fest, daß „somit auch aus dem auf Papier aufgetragenen Prothrombin eine merkliche Menge Thrombin im Verlaufe der Elektrophorese gebildet worden sein“ müsse.

Diese Beobachtung *Schultzes* und *Schwicks* ist für die Beurteilung der vorliegenden Versuchsergebnisse insofern von Bedeutung als sie zeigt, daß anscheinend auch hochgereinigtes Prothrombin bei der P. E. auf calciumhaltigem Papier wenigstens teilweise zu Thrombin aktiviert wird. Die Beobachtung steht zudem im Einklang mit dem Befund, daß auch im Pherogramm eines lipoidextrahierten, thrombokinasefreien, im Recalcifizierungsversuch nicht mehr gerinnbaren „Plasmas“ eine Fibrinbande in Erscheinung treten kann.

Nicht erklärt wird hiermit das Fehlen der Bande im Pherogramm gelagerten Plasmas. Da dieses einen gegenüber frischem Plasma nur wenig herabgesetzten Prothrombingehalt aufweist, wäre das Ausbleiben des Effektes am ehesten mit einer reversiblen Veränderung des Prothrombins im Verlauf der Plasma-lagerung zu erklären, wie dies bei längerem Lagern gereinigter Prothrombinlösung der Fall zu sein scheint (*McClaghry* und *Seegers*<sup>9</sup>). Daß die mit der Plasmalagerung einhergehende Verminderung des Faktor-V-Gehaltes allein den Befund erklären könne, ist nach unsern Untersuchungen wenig wahrscheinlich. Der noch unaufgeklärte Befund läßt einstweilen zahlreiche Deutungen zu; er veranlaßt u. a., die alte Serozym-Lehre *Bordets* unter Berücksichtigung des gegenwärtigen Standes der Gerinnungsphysiologie zu überdenken.



Bei der Trennrohrelektrophorese von hochgereinigtem Prothrombin wird dieses nicht aktiviert, wie die Elektrophoreseuntersuchungen im „Zitratexperiment“ von *Seegers*<sup>15</sup> erkennen lassen: Selbst in 25 %iger Natriumzitrat-Lösung in Aktivierung begriffenes Prothrombin sowie dabei auftretende Zwischenprodukte zeigen im Elektrophorese-Diagramm ihre charakteristischen Zacken, die sich von denen des aktiven Thrombins deutlich unterscheiden. Das elektrische Feld kann also für die bei der Plasma-P. E. auftretende Prothrombinaktivierung wohl als auslösende, jedoch nicht als einzige Ursache angesehen werden. Wie das Ergebnis der Plasma-P. E. auf säuregewaschenem Filtrierpapier zeigt, genügt zur Aktivierung auch nicht der zusätzliche Einfluß der Papieroberfläche, wenn nicht außerdem eine minimale Calciumkonzentration gegeben ist. Der Einfluß der Benetzbarkeit der Oberflächen wird bekanntlich auf Verschiedenheiten der elektrischen Ladungsverhältnisse, d. h. also, auf das Wirksamwerden von — durch Grenzflächenerscheinungen bedingten — Potentialdifferenzen, zurückgeführt. Es erscheint daher berechtigt, dem Einfluß der Papieroberfläche und dem der angelegten Potentialdifferenz auf das Zustandekommen der Prothrombinaktivierung während der P. E. das gleiche Wirkprinzip zu Grunde zu legen. Die elektrische Spannungsdifferenz würde dann eine Veränderung (Steigerung, Minderung oder Umkehr) der Oberflächenwirkung der Papiers verursachen. Hierfür spräche auch die Tatsache, daß bereits Spannungen von der Größenordnung biologisch möglicher Potentiale bei der P. E. eine prothrombinaktivierende Wirkung zu entfalten vermögen. Weitere Untersuchungen zu dieser Frage sind im Gange.

In diesem Zusammenhang sei auf Versuchsergebnisse hingewiesen, die *Sawyer, Deutch und Pate*<sup>11</sup> im Tierexperiment erhielten. *Sawyer* und Mitarbeiter untersuchten die zwischen Intima und Adventitia der Hundeorta auftretenden Potentiale und fanden, daß die Intima eines normalen Gefäßstammes eine sehr schwache negative Ladung trägt, die nach Einheilung frischer Homöotransplantate gewöhnlich deutlich ansteigt („healing peak“). Bei mehreren dieser Versuche wurde dagegen das gemessene Intimapotential vorübergehend (bis zu mehreren Tagen) in einem Bereich von 5—15 mV umgekehrt. Eine solche Umkehr des Ladungssinnes führte regelmäßig zu einer Thrombose. Ferner zeigte sich, daß in einem künstlich angelegten, schwachen elektrischen Feld von ca. 1—2 mV an der positiven, nicht aber an der gegenüberliegenden negativen Wand eines normalen Gefäßes eine Thrombose entstand. Die Autoren folgern aus ihren Versuchsergebnissen: „Diese und andere Untersuchungen weisen darauf hin, daß die elektrische Ladung der Intima bei thrombotischen Prozessen von Bedeutung ist.“

Die hier mitgeteilten Befunde dürften aus einer anderen Sicht ebenfalls auf die Bedeutung von Potentialdifferenzen für den Gerinnungseintritt hinweisen. Sie zeigen nämlich, daß in einem auf durchfeuchtetem Filtrierpapier wandernden frischen Plasma unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes von der Größenordnung bioelektrischer Potentiale bei Anwesenheit geringer Calciummengen eine Aktivierung des Plasma-Prothrombins und somit eine Gerinnung des Fibrinogens zustande kommt.

### Zusammenfassung

Während der P.E. frischen Oxalat- oder Zitratplasmas kommt es unter den üblichen methodischen Bedingungen, insbesondere bei Verwendung der gebräuchlichen ungewaschenen Filtrierpapiersorten, zu einer Gerinnung des Fibrinogens, die sich im Auftreten einer Fibrinbande („Nachfraktion“) äußert. Eine brauchbare Auftrennung der Plasma-Proteine mittels P.E. ist daher durch solche Kunstgriffe zu erzielen, die den Gerinnungseintritt auf dem Papier verhindern.

In vergleichenden papierelektrophoretischen Untersuchungen mit ungeladener Indikatorsubstanz und in Harnstoff gelöstem Fibrin ließ sich zunächst ein indirekter Beleg für die Vermutung erbringen, daß der Stoff der „Nachfraktion“ Fibrin sei. Bestätigt wurde diese Annahme durch die Feststellung, daß für den Gerinnungseintritt die Anwesenheit eines thermolabilen, nicht ultrafiltrierbaren Plasmabestandteils, der als Prothrombin erkannt wurde, in der aufzutrennenden Fibrinogenlösung sowie die Gegenwart kleiner Calciummengen im verwendeten Filtrierpapier notwendig sind.

Diese Voraussetzungen, die in „durchlaufchromatographischen“ Versuchen erfüllt waren, bedingen allein noch nicht das Auftreten einer Fibrinbande. Die zur Auslösung der Gerinnung während der P.E. notwendige Prothrombinaktivierung kommt vielmehr unter der Einwirkung der angelegten elektrischen Spannung zustande. Die Mindestgröße der hierzu notwendigen Potentialdifferenz liegt (bei etwa einstündiger Einwirkung) im Größenordnungsbereich bioelektrischer Potentiale. — Nach Diskussion der Befunde wird auf die mögliche Bedeutung von Potentialdifferenzen für den Eintritt der Blut- bzw. Plasmagerinnung hingewiesen.

### Summary

The difficulties arising, when plasma is investigated by normal paper electrophoresis, are explained. During the paper electrophoresis of plasma a coagulation occurs represented by the appearance of a fibrin band. The necessary activation of prothrombin (on calcium containing filter paper) is partially elicited by the electric potential difference attached. The possible importance of potential differences is stressed in regard to the beginning of blood coagulation.

### Résumé

On explique les difficultés survenant lors de l'électrophorèse au papier du plasma. Pendant cette opération il se produit une coagulation se traduisant par l'apparition d'une bande de fibrine. L'activation nécessaire de la prothrombine (sur papier-filtre au calcium) est déterminée en partie par la différence de tension électrique. On indique l'importance possible des différences de tension en ce qui concerne l'apparition de la coagulation du sang.

### Schrifttum

- 1 Antweiler, H. J., Die quantitative Elektrophorese in der Medizin, Berlin 1952
- 2 Berkeš, I u. V. Karas, Biochem. Zschr. **234** (1953): 499 — 3 Deutsch, E. u. W. Schaden, Biochem. Zschr. **324** (1953): 266 — 4 Diebold, W. u. L. Jühling, Biochem. Zschr. **296** (1938): 389 — 5 Hopkins, F. G., Nature (Lond.) **30** (1930): 328 u. 383 — 6 Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl., I. Bd., 1953 — 7 Lorand, L., Hungar. acta physiol. **1** (1948): 192 — 8 ders., Nature **166** (1950): 694 — 9 McClaughry, R. C. u. W. H. Seegers, Proc. Soc. exper. Biol. Med. **80** (1955): 372 — 10 MacFarlane, R. G., J. W. Trevan u. Adele M. P. Attwood, J. Physiol. **99** (1941): 7 P — 11 Sawyer, P. N., B. Deutch u. J. W. Pate, Thrombose und Embolie. I. Internat. Tagung, Basel 1954 — 12 Scheiffarth, F., G. Berg u. H. Götz, Zschr. Physiol. Chem. **302** (1955): 126 — 13 Schröer, H., Zschr. Biol. **108**: 459 — 14 Schultze, H. E.



u. G. Schwick, Zschr. Physiol. Chem. **289** (1955): 26 — 15 Seegers, W. H., R. I. Mc Claghry u. J. L. Fahey, Blood **5** (1950): 421 — 16 Steger, J., Die hepato-cerebrale Degeneration, eine Stoffwechselerkrankung, Habil.schrift Würzburg 1955, Med. Fak. — 17 Wöhlisch, E., a) Erg. Physiol. **43** (1940): 174; b) Zschr. Med. **40** (1924): 137 — 18 Wuhrmann, F. u. Ch. Wunderly, Die Bluteiweißkörper des Menschen, 2. Aufl., Basel 1952 — 19 Wunderly, Ch. Die Papierelektrophorese, Aarau u. Frankfurt/M. 1954

*Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München  
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. A. W. Forst)*

## **Über den mechanischen Einfluß der Kontraktion auf die Durchblutung des Skelettmuskels**

*Von Wolfgang Felix und Friedrich-Wilhelm Bremer*

Mit 5 Abbildungen

Eingegangen am 4. Juni 1956

Aus alten Untersuchungen geht hervor, daß der sich kontrahierende Muskel seine Gefäße komprimiert (*Chaveau* und *Kaufmann* 1877, *W. Tschuewsky* 1903). *W. H. Gaskell* (1878), *H. Burton-Opitz* (1903), *J. Linhard* (1920) und vor allem *G. V. Anrep* und *E. v. Saalfeld* (1935) teilen mit, daß während des Tetanus der Blutstrom erheblich gedrosselt, wenn nicht ganz unterbrochen wird. Demgegenüber werden nach *K. Kramer* und *W. Quensel* (1938), sowie nach *E. Bülbring* und *J. H. Burn* (1939) die Muskelgefäße nur zu Beginn des Tetanus komprimiert. Anschließend erweitern sich die Gefäße, so daß der Blutstrom sogar über den Ausgangswert ansteigt. *Y. Henderson* (1936) zufolge ändert der Muskel seine Durchblutung mechanisch nicht nur durch die Kontraktion, sondern bereits durch seinen Tonus.

Durch Gefäßkompression kann die Strömung aber auch gefördert werden, wenn der Muskel sich wiederholt kontrahiert (*H. Barcroft* und *A. C. Dornhorst* 1949, *P. V. Karpovich* 1953). Der Muskel preßt hierbei das Blut in die Venen, den Ort des geringsten Widerstandes, und bei der Erschlaffung strömt arterielles Blut in die leeren Räume ein („Muskelpumpe“, „Melkeffekt“).

Nach diesen Untersuchungen ändert der Muskel die Strömung mechanisch vor allem dadurch, daß er Kapillaren und Venen komprimiert. Indessen ist unseres Wissens nicht genügend berücksichtigt, daß auch arterielle Gefäße komprimiert werden und daß hierbei der Gefäßtonus eine entscheidende Rolle spielt. Weiterhin fragt es sich, ob die Gefäße auf die Kompression nicht ihrerseits mit einer Änderung ihres Wandtonus reagieren. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Fragen untersucht.



## Methodik

Die Versuche wurden an Katzen in Chloralose-Urethan-Narkose durchgeführt (30 mg/kg Chloralose, 100 mg/kg Urethan p.os). Die Kontraktionen des Triceps surae (Achillessehne) wurden isotonisch registriert (in den Abb. gibt der Pfeil die Richtung der Kontraktion an). Der Muskel wurde direkt oder indirekt über den N. ischiadicus gereizt (Thyratron-Reizgerät mit steilen Dreiecksimpulsen, Frequenz bei tetanischer Reizung: 30 Hz). Er wurde mit 250 bis 300 g belastet. Zur Nachahmung der Kompression des sich kontrahierenden Muskels wurde ein 3–5 cm breites Band um den Ober- oder den Unterschenkel gelegt. An beiden Enden des Bandes wurde gleichmäßig gezogen und dadurch die Muskulatur komprimiert.

Der Blutdruck wurde mit Broemser'schen Glasplattenmanometern in der A. femor. seitenständig gemessen.

Der Blutsrom in der A. und V. femor., sowie die Strömungsdifferenz zwischen beiden wurden mit Thermistoren gemessen (W. Felix und H. Groll 1953, W. Felix 1955). Bei einem Teil der Versuche wurden die sondenförmigen Thermistoren nicht mehr senkrecht zur Strömung, sondern in Strömungsrichtung mit der Spitze gegen die Strömung angeordnet (s. Abb. 1).

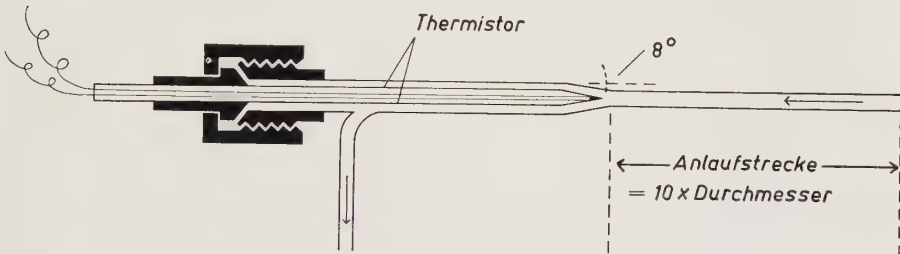


Abb. 1. Anordnung der Thermistoren für die Strömungsmessung. Das Blut wird in Richtung der Pfeile durch die Röhre geleitet.

## Ergebnisse

## 1. Kompression der Gefäße durch die Kontraktion des Muskels

Im Folgenden werden nur solche Änderungen der Strömung besprochen, welche unmittelbar mit der Muskelkontraktion einsetzen. Denn nur sie werden rein mechanisch verursacht. Dagegen treten Strömungsänderungen, welche durch Reaktionen der Gefäße hervorgerufen sind, später auf, weil diese Reaktionen ja auch erst durch die Kontraktion ausgelöst werden müssen.

Wenn sich der Muskel maximal kontrahiert, wird die arterielle Strömung unmittelbar gedrosselt und die venöse schwillt stoßartig an (Abb. 2, 3). Dieses Verhalten beider Strömungen ist nur dadurch zu erklären, daß durch die Kontraktion sowohl Venen und Kapillaren als auch arterielle Gefäße komprimiert werden. Manche Versuche erwecken den Eindruck, daß durch die plötzlich einsetzende Kontraktion die Pulswelle reflektiert oder eine entsprechende Welle ausgesendet wird. Durch die Kompression wird der lokale Strömungswiderstand erhöht. Bei maximaler

Kontraktion der Muskulatur einer Extremität kann dadurch der periphere Widerstand immerhin so stark erhöht werden, daß der Blutdruck etwas ansteigt (Abb. 4 a).

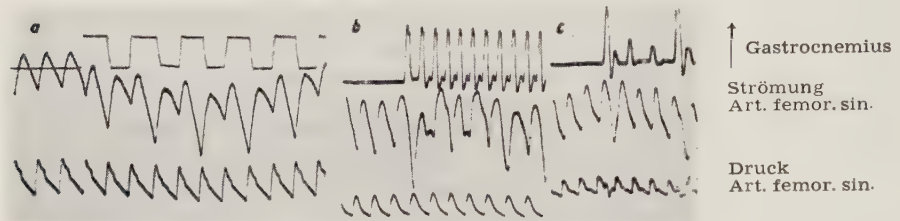


Abb. 2. Mechanische Beeinflussung der arteriellen Strömung. Direkte Reizung. a) Serie kurzer max. Tetani, b) Serie kurzer Kontraktionen durch Einzelreize, c) verschieden starke Kontraktionen.

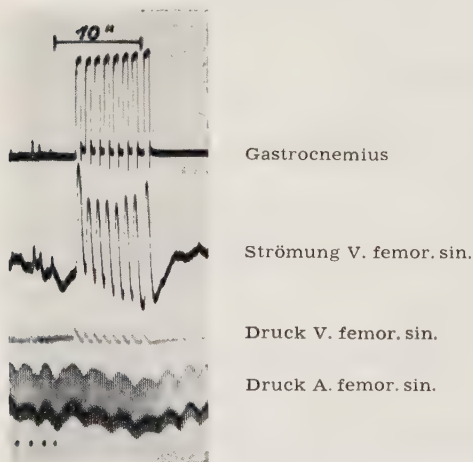


Abb. 3. Mechanische Beeinflussung der venösen Strömung. Serie kurzer Tetani. Direkte Reizung, Frequenz eines Tetanus = 40 Hz.

Das Ausmaß der Gefäßkompression hängt ab von der Größe des extra- und des intravasalen Druckes und auch von dem Tonus der Gefäße (s. w. unten). Der extravasale Druck wird durch die Stärke der Kontraktion bestimmt. Da der Blutdruck von den Arterien über Arteriolen und Kapillaren bis zu den Venen erheblich abnimmt, wird die venöse Strömung schon von schwachen, die arterielle Strömung nur von starken Kontraktionen beeinflusst. Nachfolgende schwache Kontraktionen vermindern die arterielle Strömung nicht meßbar (Abb. 2 c). Da weiterhin der

arterielle Druck von der systolischen zur diastolischen Phase des Pulses sinkt, wird die systolische Strömung weniger stark gehemmt als die diastolische (Abb. 2 a). So ändert eine Serie kurzer Kontraktionen (durch Einzelreize) die arterielle Strömung sehr unterschiedlich, je nach dem während welcher Phase des Pulses der Muskel sich gerade kontrahiert (Abb. 2 b).

## 2. Reaktionen der Gefäße auf die Kompression

In diesem Abschnitte werden Strömungsänderungen besprochen, welche im Anschluß an die rein mechanisch verursachten auftreten. Sie sind durch Reaktionen der Gefäße bedingt. Da die arteriellen Gefäße nur von starken Kontraktionen komprimiert werden, wird deren Verhalten bei maximaler Kontraktion untersucht.



Die Reaktion der Gefäße auf den mechanischen Reiz ist abzugrenzen von den lokal-chemischen und -nervösen Regulationen, welche durch den arbeitenden Muskel ausgelöst werden. Diese Regulationen setzen eine Muskularbeit voraus. Auf eine Kompression müssen die Gefäße dagegen auch dann reagieren, wenn sie nicht durch die Kontraktion, sondern durch eine Manschette von außen komprimiert werden. So ist zunächst zu untersuchen, wie sich die Durchblutung während der Muskularbeit verhält, und anschließend festzustellen, ob sich die Strömung in der gleichen Weise ändert, wenn die Kompression durch die Muskelkontraktion mit dem Manschettendruck nachgeahmt wird. Der Vergleich zeigt dann, ob die Kompression als auslösender Reiz für die Gefäßreaktionen bei Muskelarbeit eine Rolle spielt.

#### a) Strömung bei Muskularbeit

##### Maximale tetanische Kontraktion

Zu Beginn des Tetanus werden arterielle und venöse Strömung in der bereits beschriebenen Weise durch die Kompression verändert. Die arterielle Strömung läßt nach, und die venöse schwillt vorübergehend stark an und geht dann ebenfalls zurück. Danach nimmt zunächst die arterielle, dann die venöse Strömung bis weit über den Ausgangswert zu, obgleich die Stärke der Kontraktion sich nicht ändert, d. h. obgleich der extravasale Druck unvermindert erhöht bleibt. Da sich der Blutdruck währenddessen ebenfalls nicht ändert, muß diese Hyperämie durch eine Dilatation hervorgerufen werden. Der Tonus der arteriellen Gefäße läßt daher nach, so daß diese durch den Blutdruck erweitert werden. So wird in Arterien und Arteriolen die Kompression auch bei maximaler Kontraktion bereits durch das Nachlassen des Gefäßtonus überwunden. Daraus geht hervor, daß selbst bei einer maximalen Kontraktion der extravasale Druck nicht die Stärke des intravasalen, d. h. des Blutdruckes, erreicht. Der Tonus der Arterien und Arteriolen ist normalerweise so stark, daß schon ein relativ geringer Anstieg des extravasalen Druckes genügt, um die Lichtung dieser Gefäße einzuengen. Er ist auf eine große Druckdifferenz (Blutdruck/Gewebedruck) eingestellt. Wenn diese Druckdifferenz durch einen Blutdruckabfall oder — wie in unserem Falle — durch einen Anstieg des extravasalen Druckes vermindert wird, muß bei unverändertem kontraktilem Tonus die Lichtung dieser Gefäße kleiner werden. Wenn bei maximaler Kontraktion der extravasale Druck über die Stärke des Blutdruckes ansteigen würde, dann müßten die Arterien auch ohne „Mithilfe ihres Tonus“ komprimiert werden. Eine Dilatation und damit eine Hyperämie während eines maximalen Tetanus wären dann nicht möglich.

Ist dagegen, wie in den Venen, der intravasale Druck gering, dann überwiegt bei maximaler Kontraktion der extravasale Druck und komprimiert diese Gefäße, gleichgültig wie sich deren Eigentonus ändert. Der Venen-tonus beeinflußt die Kompression nur bei schwachen Kontraktionen, solange nämlich der extravasale Druck nicht über die Stärke des intravasalen ansteigt. Demgegenüber würden sich bei maximaler Kontraktion Änderungen des Venen-tonus erst dann auswirken, wenn der intravasale

Druck genügend angestiegen ist. Wegen der dünnen Muskelschicht der Venen sind deren Tonusänderungen hierbei jedoch wenig wirksam.

Wie die Kurve der a.-v. Strömungsdifferenz zeigt, fließt während des Tetanus mehr Blut in den Muskel hinein als aus ihm heraus (Abweichen der Kurve über die Linie der Strömungsgleichheit = Überwiegen des arteriellen Zuflusses; und umgekehrt). Der Blutgehalt des Gefäßnetzes nimmt also zu. Das kann nur so erklärt werden: Durch das Nachlassen ihres Tonus wird die Kompression der Arterien und Arteriolen bald überwunden. Wegen ihres geringen intravasalen Druckes bleiben Kapillaren und Venen dagegen länger komprimiert. Dadurch wird das einströmende

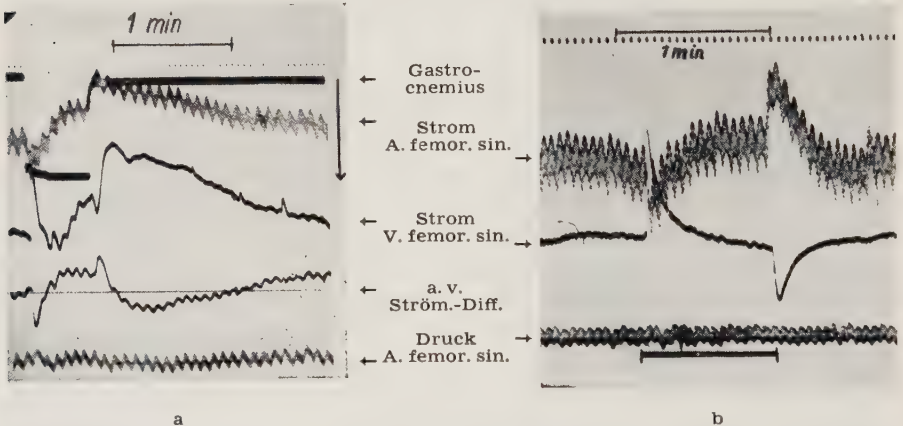


Abb. 4 a. Tetanus. Indirekte maximale Reizung. Frequenz 40 Hz. Die Linie in der Kurve der a.-v. Strömungsdifferenz gibt den Wert der Strömungsgleichheit an. Abweichen der Kurve über die Linie = Überwiegen der arteriellen Strömung; und umgekehrt.  
Abb. 4 b. Langanhaltende Manschettenkompression. Es wurde nur so stark komprimiert, daß der venöse Abfluß etwa auf dem Ausgangswert blieb.

Blut gestaut und der intravasale Druck erhöht. Dieser steigt so lange, bis er zunächst die Kapillaren und dann die Venen ausreichend entfaltet. Damit nimmt auch der venöse Abfluß zu und erreicht schließlich die Stärke des Zuflusses. (Dieses Gleichgewicht hat sich in dem Versuch der Abb. 4 a noch nicht eingestellt, als die tetanische Reizung beendet wurde).

Mit der Erschlaffung des Muskels fällt der erhöhte extravasale Druck wieder ab, so daß sämtliche Gefäße durch ihren Innendruck noch mehr erweitert werden. Das Volumen des Gefäßnetzes nimmt für kurze Zeit also weiterhin zu. Die arterielle Strömung steigt steil an und die venöse geht zurück, solange die Peripherie sich füllt, und nimmt dann ebenfalls zu. Daraufhin kontrahieren die Gefäße sich wieder. Das angestaute Blut fließt ab, so daß jetzt der venöse Abfluß überwiegt (s. a.-v. Ström.-diff.).

#### Rhythmische Tätigkeit (Abb. 5 a)

Hierbei wird mit jeder Kontraktion der arterielle Zufluß gehemmt, der venöse Abfluß dagegen gefördert („Muskelpumpe“). Dadurch verliert die Peripherie Blut. So wird bereits mit der zweiten Kontraktion weniger Blut ausgeworfen als mit der ersten (Abb. 3, 5 a). Mit jeder folgenden

Kontraktion nimmt die Menge des ausgeworfenen Blutes weiterhin so lange ab, bis durch eine Dilatation der arteriellen Gefäße ausreichend Blut nachströmt. Eine wirksame Arbeit der Muskelpumpe setzt also eine Dilatation der arteriellen Gefäße voraus.

Dieser arterielle Nachschub ist allerdings bei venöser Stauung von untergeordneter Bedeutung. Denn hierbei kommt es darauf an, daß die Muskelpumpe das angestaute Blut weiterbefördert. Die Pumpkraft ist dann beträchtlich. Nach den Untersuchungen von *Barcroft* und *Dornhorst* (1949) kann sie einen Widerstand bis zu 90 mm Hg überwinden.

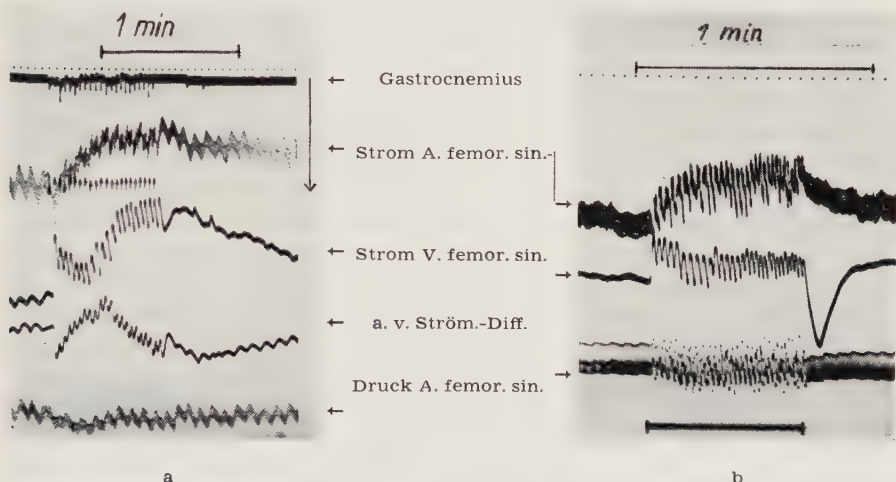


Abb. 5 a. Maximale indirekte rhythmische Reizung. Serie kurzer Tetani von  $\frac{1}{3}$  sec Dauer. Alle zwei Sekunden ein Tetanus. Frequenz = 40 Hz.  
Abb. 5 b. Rhythmische Manschettenskompressionen.

Wie bei dem lang dauernden Tetanus nimmt also auch bei rhythmischer Tätigkeit die arterielle Strömung nach anfänglicher Drosselung zu, obgleich mit jeder Kontraktion der extravasale Druck steigt. So wird auch hier durch das Nachlassen des Tonus die Kompression der arteriellen Gefäße überwunden und Blut gestaut, bis der intravasale Druck genügend angestiegen ist, um Kapillaren und Venen zu entfalten. Indessen fällt während jeder Erschlaffung der extravasale Druck ab, so daß das angestaute Blut zum Teil abfließen kann. Die Stauung erreicht daher nicht das Ausmaß wie beim lang dauernden Tetanus. Sie hängt ab von Stärke, Dauer und Häufigkeit der Kontraktionen. Daher nimmt auch der Blutgehalt des Gefäßnetzes weniger stark zu. Er wird vermehrt um die Menge des angestautes und vermindert um die Menge des ausgeworfenen Blutes. Bei kurz dauernden Kontraktionen kann er abnehmen.

#### b) Strömung bei passiver Kompression

Durch den Manschettendruck wird die Kompression, wie sie die Muskelkontraktion verursacht, keineswegs genau nachgeahmt. Von der Manschette wird nur ein 3—5 cm breiter Teil des Ober- oder Unterschenkels



umfaßt. An dieser Stelle werden aber sämtliche Gefäße, also auch die zwischen den Muskeln verlaufenden und die Hautgefäße, komprimiert. Durch starken Manschettendruck wird der venöse Abfluß aus dem distal von der Manschette liegenden Teil der Extremität gedrosselt, bzw. unterbrochen. Bei rhythmischen Kompressionen kann während jeder Lösung der Manschette dieses Blut zum Teil nachfließen. Es wird dann von der folgenden Kontraktion erfaßt und herzwärts befördert. So wird durch den rhythmischen Manschettendruck die stationäre venöse Strömung aus dem distal von der Manschette liegenden Teil der Extremität in eine pulsierende umgewandelt. Diese „Pulse“ addieren sich dem Blut, welches den unter der Manschette liegenden Muskeln entstammt. Es würde aber nur das Verhalten dieser Strömung interessieren. Zur Nachahmung der Kompression durch den lang dauernden Tetanus wird mit der Manschette nur so stark komprimiert, daß die venöse Strömung nach dem anfänglichen stoßartigen Anstieg etwa auf dem Ausgangswert gehalten wird.

Damit scheidet aber die venöse Strömung aus der Betrachtung aus, da sie willkürlich verändert wurde. Es interessiert lediglich das Verhalten der arteriellen Strömung, und nur insoweit, als der Gefäßtonus nachläßt, wenn der extravasale Druck erhöht wird.

Sowohl bei lang anhaltendem (Abb. 4 b) als auch bei rhythmisch erhöhtem (Abb. 5 b) Manschettendruck steigt die arterielle Strömung nach anfänglichem Rückgang über den Ausgangswert an, ohne daß der Blutdruck zunimmt. Die Gefäße werden also weiter, d. h. die Kompression, bzw. die Erhöhung des extravasalen Druckes bewirkt, daß der Gefäßtonus nachläßt. Der Gefäßtonus läßt stärker nach als es notwendig wäre um die Strömung wieder auf den Ausgangswert ansteigen zu lassen. Diese zusätzliche Tonusabnahme ermöglicht die Dilatation. Tonusänderungen beeinflussen die Strömung jedoch nur, solange der Manschettendruck nicht bis zur Stärke des Blutdruckes erhöht wird, bzw. solange der intravasale Druck größer ist als der extravasale, wie bereits erwähnt.

Nach Beendigung der Manschetttenkompression steigt die Strömung steil an, ebenso wie nach Muskularbeit, da, nachdem der extravasale Druck abfällt, die Gefäße durch den Blutdruck zunächst noch mehr dilatatiert werden. Jedoch kehrt die Strömung relativ schnell wieder auf den Ausgangswert zurück. Nach Muskularbeit (Abb. 4 a, 5 a) bleibt die Strömung dagegen über längere Zeit erhöht, da der anfänglich mechanisch bedingte Strömungsanstieg durch die Reaktive Hyperämie überlagert wird.

### *Besprechung*

Die Versuche zeigen, daß durch die Kontraktion nicht nur Venen und Kapillaren, sondern auch Arterien und Arteriolen komprimiert werden. Bei den arteriellen Gefäßen hängt der Grad der Kompression entscheidend von dem Gefäßtonus ab, weil der extravasale Druck auch bei maximaler Kontraktion nicht bis zur Höhe des intravasalen, d. h. des Blutdruckes, ansteigt.

Bei lang anhaltender tetanischer Kontraktion nimmt die Strömung nach anfänglicher Drosselung über den Ausgangswert zu. Wir bestätigen damit

die Ergebnisse von *Kramer* und *Quensel* (1938) sowie von *Bülbring* und *Burn* (1939). Die Tatsache der Zunahme der Strömung während des Tetanus wurde erstmalig von *Keller*, *Loeser* und *Rein* (1930) sowie *H. Rein* und Mitarb. (1931, 1935) beschrieben. Jedoch lehnen diese Autoren eine mechanische Beeinflussung der Strömung durch den Muskel ab. Der starke Anstieg der venösen Strömung zu Beginn der Kontraktion soll durch eine Reizung vasodilatatorischer Fasern verursacht werden. *Kramer* und *Quensel* (1938) haben diese Interpretation *Reins* sowie die Unterschiede zwischen den Ergebnissen von *Rein* und Mitarb. und denen von *Anrep* und Mitarb. bereits eingehend besprochen. Es sei daher auf diese Mitteilung verwiesen.

Nach unseren Versuchen bewirkt das Ansteigen des extravasalen Druckes ein Nachlassen des Tonus der Muskelgefäße; und zwar läßt der Tonus überschießend nach, so daß die Gefäße durch den intravasalen Druck erweitert werden. Einen ähnlichen Effekt an den Gefäßen der Froschschwimmhaut beschreiben *Langendorf*, *Schönbach* und *Zahn* (1955). Auf welche Weise die Erhöhung des extravasalen Druckes diesen Effekt verursacht, geht aus unseren Versuchen nicht hervor. Zu denken ist hierbei vor allem daran, daß die Verminderung der Wandspannung (Entdehnung) als auslösender Reiz wirkt, wie dies auch *Langendorf*, *Schönbach* und *Zahn* vermuten, oder daß durch die Kompression vielleicht vasoactive Stoffe freigesetzt werden (z. B. Histamin).

Da einerseits für die Arbeitshyperämie die Dilatation der Arterien und Arteriolen notwendig ist und andererseits durch die Kontraktion aber vor allem Kapillaren und Venen komprimiert werden, so muß von diesen Gefäßen ein Reflex ausgehen, welcher den Tonus der arteriellen Gefäße vermindert. Nach *Krogh* (1924) kann durch mechanische Reizung der Kapillaren (Froschzunge) die zugehörige Arteriole erweitert werden. Da diese Reaktion auch nach Durchschneidung des Nerven, welcher das Untersuchungsgebiet versorgt, auftritt, vermutet *Krogh* einen lokalen Axonreflex. Möglicherweise wird auch in unserem Falle der Reiz durch einen Axonreflex übertragen. Indessen werden bei starken Kontraktionen auch arterielle Gefäße komprimiert, so daß diese vielleicht bereits darauf mit einer Verminderung ihres Tonus reagieren.

Da durch die Muskelkontraktion der extravasale Druck ebenfalls erhöht wird, muß über den gleichen Mechanismus eine Dilatation ausgelöst werden. Quantitative Aussagen können noch nicht gemacht werden. Jedenfalls wird die Arbeitshyperämie zum Teil durch die Erhöhung des extravasalen Druckes verursacht.

#### *Zusammenfassung*

An Katzen in Chloralose-Urethan-Narkose wird der mechanische Einfluß der Kontraktion des Skelettmuskels auf seine Durchblutung an einer hinteren Extremität untersucht.

Die Kontraktion erhöht den extravasalen Druck und dadurch werden die Gefäße komprimiert. Das Ausmaß der Kompression hängt ab von der Stärke des extra- und intravasalen Druckes sowie vom Gefäßtonus. Wenn allerdings der Außendruck größer ist als der Innendruck, spielen Tonusänderungen keine Rolle mehr, da die Gefäße kollabieren. In den arteriellen Gefäßen ist der Blutdruck stets stärker als der extravasale Druck, und zwar auch bei maximaler

Kontraktion. Jedoch ist der Eigentonus der arteriellen Gefäße so stark, daß auch bei einer relativ geringen Erhöhung des Außendruckes die Lichtung verengt wird, und dementsprechend wird diese Kompression bereits durch das Nachlassen des Gefäßtonus überwunden.

Durch die Kompression wird der arterielle Zufluß gedrosselt und der venöse Abfluß gefördert, so daß bei rhythmischer Arbeit die Peripherie Blut verliert; und zwar so lange, bis durch die Dilatation der arteriellen Gefäße genügend Blut nachströmt. Ein wirksames Arbeiten der „Muskelpumpe“ setzt daher eine Dilatation der arteriellen Gefäße voraus.

Auf die Erhöhung des extravasalen Druckes reagieren die Gefäße mit einem Nachlassen ihres Tonus, so daß sie durch den intravasalen Druck erweitert werden. Die Arbeitshyperämie wird zum Teil durch das Ansteigen des extravasalen Druckes ausgelöst.

#### Summary

The pressure outside the blood vessels increases during the contraction of the skeletal muscle and the vessels are compressed. The degree of compression depends of the prevailing pressures inside and outside the vessels and of the tension of the vessel wall. The hyperemia during muscle work is partly caused by the increased extravascular pressure.

#### Résumé

La contraction du muscle strié augmente la pression extravasculaire. De cette manière les vaisseaux sont comprimés. Cette compression dépend d'une part de l'augmentation de la pression extravasculaire et d'autre part de la pression intravasculaire et aussi de la tension de la parois vasculaire. Pendant le travail du muscle l'hyperémie est déclenchée en partie par l'augmentation de la pression extravasculaire.

#### Schrifttum

- Anrep, G. V., J. Physiol. **85** (1935): 409 — ders. a. E. v. Saalfeld, J. Physiol. **85** (1935): 375 — Barcroft, H. a. A. C. Dornhorst, J. Physiol. **109** (1949): 402 — Bülbring, E. a. J. H. Burn, J. Physiol. **95** (1939): 203 — Burton-Opitz, H., Amer. J. Physiol. **9** (1903): 161 — Chaveau u. Kaufmann, Compt. rend. Acad. sc. Paris **104** (1878): 1126; zit. nach K. Hürthle, Handbuch der norm. u. path. Physiol. 1927, VII/2, S. 1492 — Felix, W. u. H. Groll, Zschr. Biol. **106** (1953): 208 — ders., Zschr. Biol. **108** (1955): 122 — Gaskell, W. H., J. Physiol. **1** (1878): 108 — Henderson, Y., Münch. Med. Wschr. **1936**: 308 — Karpovich, P. V., Monographie: Physiology of Muscular Activity, Philadelphia and London 1953 — Keller, Ch. J., A. Loeser u. H. Rein, Zschr. Biol. **90** (1930): 274 — Kramer, K. u. W. Quensel, Pflügers Arch. **239** (1937): 620 — Krogh, A., J. Physiol. **52** (1919): 409 u. 457 — ders., Monographie: Anatomie und Physiologie der Capillaren, Berlin 1924 — Langendorf, H., G. Schönbach u. R. K. Zahn, Zschr. exper. Med. **126** (1955): 82 — Linhard, J., Scand. Arch. Physiol. **40** (1920): 145; zit. nach Liljestrand, Arch. exper. Path. Pharm. **138** (1928): 23 — Rein, H., Erg. Physiol. **32** (1931): 28; ders., Pflügers Arch. **248** (1944): 111; ders., O. Mertens u. M. Schneider, Pflügers Arch. **236** (1935): 636 — W. Tschewewsky, Pflügers Arch. **97** (1903): 289



Aus dem Oto-Rhino-Laryngologischen Institut der Universität Hiroshima  
(Vorstand: Prof. Dr. H. Tsukamoto)

## Über den Statolithen in den Sinneskörpern der Meduse *Aurelia aurita*

Von T. Yamashita

Mit 5 Abbildungen

Eingegangen am 1. Juli 1956

Seit den Untersuchungen von *de Burlet*, *Hoffman* u. a. über die mikroskopische Struktur der Statolithen (Otolithen) des Menschen haben sich verschiedene Autoren auch für die Beschaffenheit der Statolithen verschiedener Tierarten interessiert. Die heute üblichen Vorstellungen über die feinere Struktur der Statolithen haben jedoch leider recht hypothetischen Charakter, so daß weitere Untersuchungen notwendig erscheinen. Bei den Scyphomedusen findet man einen kleinen, weißen, rundlichen Statolithen in jedem Sinneskörper (Randkörper), der sich ohne Schwierigkeit herausziehen läßt. Im Gegensatz zu der bisherigen Ansicht, daß diese Statolithen nur aus  $\text{CaCO}_3$  bestehen, haben wir auch noch andere Bestandteile nachweisen können, wodurch die im folgenden zu beschreibenden Ergebnisse uns der Mitteilung wert erscheinen.

### 1. Mikroskopische Befunde.

Der Statolith in dem Randkörper von *Aurelia* hat keine einheitlich solide Struktur, sondern stellt eine Ansammlung von Hunderten von einzelnen „Statolithenkörperchen“ dar, die von einer gemeinsamen Hülle umgeben sind. Diese Körperchen sind in der Regel mehrseitig, meist sechseckig, oder auch vier- oder dreieckig. Sie erwecken zunächst den Eindruck, als wären sie einzelne Kristalle. Die Außenfläche jedes einzelnen Körperchens erscheint im frischen Zustand kurz nach der Herausnahme aus dem Randkörper zunächst schwarzbraun, so daß sich die Körperchen durch kräftige Konturen auszeichnen. Das Innere eines jeden Körperchens ist jedoch verhältnismäßig durchsichtig. Die Ecken der Körperchen erscheinen meist mehr oder weniger abgerundet (Abb. 1, 2).

Zur genaueren Untersuchung der Mikrostruktur der Statolithenkörperchen ließen wir verschiedene verdünnte oder gesättigte Lösungen auf sie

einwirken und beobachteten, in welcher Weise eine Auflösung, Zersetzung oder Veränderung der Körperchen eintrat.

Zuerst untersuchten wir die Wirkung von sauren Lösungen. Als Lösungsmittel verwendeten wir entweder destilliertes Wasser oder Seewasser. Wir konnten feststellen, daß die Lösungen von Salzsäure in destilliertem Wasser die Statolithenkörperchen sogleich zur Auflösung und zum



Abb. 1. Frischer Statolith von *Aurelia aurita* (150  $\times$ ).



Abb. 2. Frische Statolithenkörperchen von *Aurelia aurita* (150  $\times$ ).

Zerfall brachten. Bei Verwendung von Seewasser hingegen als Lösungsmittel trat bei gleicher Salzsäurekonzentration der Zerfall bzw. die Auflösung des Körperchens etwas später auf.

Bei der Beobachtung der Wirkung von destilliertem Wasser auf die Statolithenkörperchen fanden wir, daß sich im Verlauf von etwa 25 Minuten die Außenschicht an einigen Stellen auflöste. Nach einer Stunde verschwanden die Konturen der Körperchen vollständig und es blieben höchstens Spuren zurück (Abb. 3). Im Seewasser hingegen traten keine Veränderungen auf.

Weiterhin wurde der Einfluß alkalischer Lösungen auf die Statolithenkörperchen untersucht. Wurde in Seewasser als Lösungsmittel Natriumbikarbonat bis zur Sättigung gelöst, so trat an den Körperchen bis auf eine geringe Verdichtung keine wesentliche Veränderung auf. Wurde hingegen ein Statolithenkörperchen in eine gesättigte Natriumbikarbonatlösung mit destilliertem Wasser als Lösungsmittel gebracht, so kamen bereits nach etwa 5 Minuten einige Stellen der Oberfläche des Körperchens zum Zerfall. Es entstanden auf diese Weise zahlreiche Löcher, durch die etwa 10—20 sehr kleine durchsichtige „Mikrokörperchen“ von sechseckiger, rechteckiger oder elliptischer Form hervortraten.

Anschließend untersuchten wir die Wirkung einer gesättigten Natriumchloridlösung. In dieser Lösung zeigten die Körperchen keine sofortigen Veränderungen. Die Konturen wurden nach und nach kräftiger und die

durchsichtige Substanz im Inneren des Körperchens nahm eine körnige Beschaffenheit an. Offenbar kam es zu einer Verdichtung des Inhaltes. Nach etwa 20—30 Minuten bekam die Oberfläche des Körperchens eine bucklige oder höckerige Beschaffenheit, und darauf teilte sich das Körperchen in zwei oder mehrere kleinere Gebilde, die auch nach einer Stunde noch nicht verschwunden waren. Wenn die Statolithenkörperchen in eine 10%ige Formalinlösung gebracht wurden, begann der Zerfall erst nach einer Woche. Erst nach etwa 2 Wochen war der Zerfall vollständig.

Diese Versuche zeigen also, daß durch die verschiedenen Lösungen ganz verschiedene Wirkungen auf die Statolithen-Substanz ausgeübt werden, was bisher nicht bekannt war. Diese Befunde sind mit der bisherigen Ansicht, daß der Statolith aus Kristallen von  $\text{CaCO}_3$  besteht, nicht vereinbar.

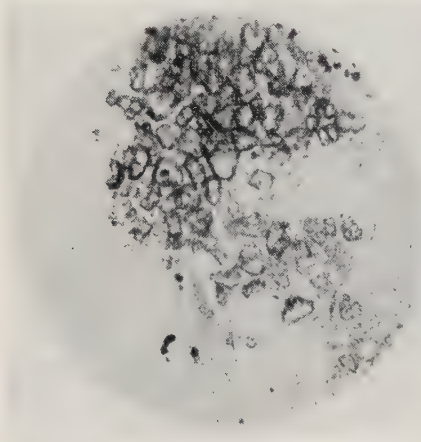


Abb. 3. Statolithenkörperchen in destilliertem Wasser (150 X).

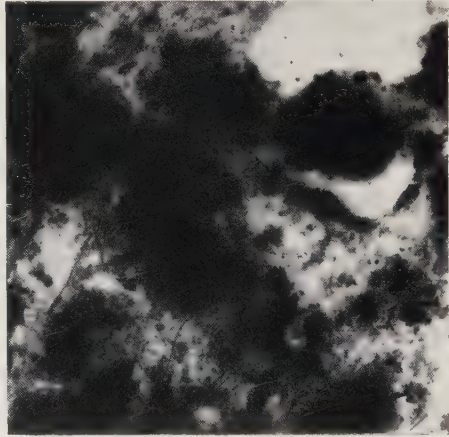


Abb. 4. Statolithenkörperchen in destilliertem Wasser (elektronenmikroskopisch).

## 2. Elektronenmikroskopische Befunde.

Es wurde zum ersten Mal der Versuch unternommen, die Struktur der Medusen-Statolithen mit dem Elektronenmikroskop zu untersuchen. Ein Statolithenkörperchen wurde der Einwirkung von destilliertem Wasser ausgesetzt, und wenn es eben zu zerfallen begann, wurde es möglichst schnell auf den Präparatsträger des Elektronenmikroskops gebracht, getrocknet und beobachtet. Stets fanden sich im Inneren des zerfallenden Körperchens die bereits erwähnten „Mikrokörperchen“, jedoch niemals irgendeine kristalline Substanz (Abb. 4). Das im Elektronenmikroskop erhaltene Bild war das eines amorphen Körpers. Außerdem traten jedoch auch Projektionsbilder auf, die einem Oktaeder oder einem geneigten regulären Hexaeder entsprachen. Diese Bilder waren offenbar auf einen Teil der Mikrokörperchen zurückzuführen. Die Mikrokörperchen wurden unter verschiedenen Bedingungen elektronenmikroskopisch untersucht und zeigten dabei stets wechselnde Formen. Sie besitzen also keine einheitliche Kristallstruktur.



### 3. Untersuchungen über Elektronenbeugung.

Weiterhin untersuchten wir die Statolithen-Substanz mit Hilfe des Verfahrens der Elektronenbeugung, um die Mikrostruktur noch eindeutiger zu bestimmen. Bei den Statolithenkörperchen fand sich kein Durchgang von Elektronenstrahlen und auch bei den Mikrokörperchen nur ein geringer Durchgang und ein nur undeutlicher ringförmiger Halo. Die Mikrokörperchen bestehen also im wesentlichen aus einer nichtkristallinen Substanz. In einigen Fällen zeigten sich jedoch einige diesen Halo überlagernde v. Laue'sche Flecken. Wir ziehen daraus den Schluß, daß die Mikrokörperchen aus amorphen Substanzen sowie auch einzelnen Mikrokristallen zusammengesetzt sind.

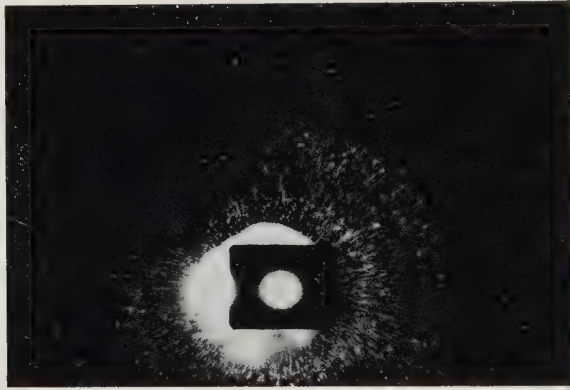


Abb. 5. Röntgen-Strahlen-Beugung bei einem Statolithenkörperchen. Radial angeordnete v. Lauesche Flecken.

### 4. Röntgenstrahlenbeugung.

Zur Untersuchung der kristallinen Substanzen in den Körperchen wandten wir anschließend das Verfahren der Röntgenstrahlenbeugung an und konnten auch hiermit das Vorkommen kristalliner Substanzen klar bestätigen (Abb. 5). Obgleich die Anordnung der v. Laue'schen Flecken etwas unregelmäßig war, konnten wir doch feststellen, daß es sich in den Körperchen um Mikrokristalle mit einem Durchmesser zwischen  $1\ \mu$  bis  $100\ \mu$  handeln muß.

### 5. Spektralanalyse der Körperchen.

Wir versuchten nun festzustellen, welche Elemente in der Statolithen-Substanz vorhanden sind. Mit Hilfe der Spektralanalyse konnten wir außer Ca auch Mg, Si, Na, Sr, Fe und Cu feststellen. Der Menge nach überwog das Ca bei weitem, es folgten Mg und Si, eine geringere Menge Na, eine noch geringere Sr und Spuren von Fe und Cu.

### Zusammenfassung

Bisher wurde allgemein angenommen, daß die Statolithen (oder Otolithen) der verschiedenen Tierarten aus  $\text{CaCO}_3$ , in der Kristallform entweder des Calcits oder des Aragonits, bestehen. Unsere Untersuchungen ergaben, daß die Zusammensetzung und Struktur der Statolithen in den Randkörpern der

Medusen tatsächlich eine ganz andere ist. Bei der Untersuchung mit verschiedenen Lösungen traten spezifische Vorgänge einer Umformung, eines Zerfalls oder einer Auflösung auf. Der Statolith stellt einen mit zahlreichen, unregelmäßigen Körperchen gefüllten Sack dar. Die einzelnen Statolithenkörperchen bestehen wiederum aus zahlreichen Mikrokörperchen. Die Grundsubstanz dieser Mikrokörperchen ist amorph, in sie hinein sind einzelne Mikrokristalle eingebettet. Außer dem mengenmäßig überwiegend vorkommenden Ca fanden sich Mg, Si, Na, Sr und in Spuren Cu und Fe.

#### Summary

Up to now, it has been generally accepted that the statoliths (or otoliths) of the various species of animals consist of  $\text{CaCO}_3$  in the crystalline form of calcite or aragonite. The present investigations have shown that the composition and the structure of the statoliths in the sense organs (margin bodies) of the medusae are in fact completely different. Using various solutions the author observed specific reactions of transformation, decomposition or dissolution. The statolith is represented by a bag filled with numerous irregular bodies; these statolith bodies consist of numerous microbodies. The ground substance of the microbodies is amorph; micro-crystals are embedded into it. Besides of the quantitatively dominating occurring Ca also Mg, Si, Na, Sr and, in traces, Cu and Fe have been found.

#### Résumé

Jusqu'à présent on avait supposé que les statolithes (ou otolithes) des différentes sortes d'animaux se composent de  $\text{CaCO}_3$  sous la forme cristalline de calcite ou d'aragonite. Les recherches ont prouvé que la composition et la structure des statolithes dans les organes marginaux des méduses sont d'autre sorte. Par des solutions différentes on a provoqué des phénomènes spécifiques d'une transformation, d'une décomposition ou d'une dissolution. Le statolithe a la forme d'un sac rempli de nombreux corpuscules irréguliers. Ces corpuscules se composent à leur tour de nombreux microcorpuscules. La substance fondamentale des microcorpuscules est amorphe; des microcristaux sont insérés dans cette substance. Outre le Ca qui domine, on trouve Mg, Si, Na, Sr et des traces de Cu et de Fe.

#### Schrifttum

1 Engström, H., Acta oto-laryng. **15** (1951): 1 — 2 Miyata, J., I. Otol., Tokyo **57** (1954): 349 — 3 Sasagawa, K., Electron-Microscope **1953** — 4 Sasaki, H. und J. Miyata, Otologia, Tokyo, **25** (1953): 361 — 5 Winterstein, H., Handbuch der vergleichenden Physiologie Bd. **4**, 1913 — 6 Yamashita, T., Hiroshima J. Med. Sciences (engl.) **4** (1955): 41

*Aus dem Oto-Rhino-Laryngologischen Institut der Universität Hiroshima  
(Vorstand: Prof. Dr. H. Tsukamoto)*

## **Das Aktionspotential der Sinneskörper (Randkörper) der Meduse *Aurelia aurita***

*Von T. Yamashita*

Mit 3 Abbildungen

Eingegangen am 1. Juli 1956

Eine Beantwortung von Reizen durch bestimmte Reaktionen findet man bei allen tierischen Lebewesen, jedoch sind eigentliche Sinnesorgane zuerst bei den Coelenteraten ausgebildet. Bei den Scyphomedusen sind bereits seit den Untersuchungen von *Hertwig*, *Bethe* u. a. gegen Ende des vorigen Jahrhunderts Sinneskörper am Schirmrande bekannt, die meist als Randkörper bezeichnet werden. Es handelt sich um ein klöppelförmiges Organ, das an seiner Spitze den von einer Blase umgebenen Statolithen trägt. Wie in der voraufgegangenen Arbeit gezeigt wurde, stellt dieser Statolith tatsächlich eine Ansammlung sehr zahlreicher Einzelkörperchen dar. Obgleich über die Bedeutung der Randkörper für die Aufrechterhaltung einer bestimmten Lage und Stellung des Tieres im Raum und für die Ausführung gerichteter Bewegungen bereits mehrere Arbeiten vorliegen (*Bethe*, *Bozler* u. a.), ist doch über die mit der Tätigkeit dieses Sinnesorgans verbundenen bioelektrischen Erscheinungen bisher noch nichts bekannt. Eine Untersuchung der Aktionspotentiale dieses Sinnesorgans wäre vor allem deswegen interessant, weil man schon seit den ersten Untersuchungen hierüber annehmen muß, daß es Rezeptoren für verschiedene Reizarten enthält, so z. B. auch Rezeptoren für Lichtreize. Unsere Untersuchungen betreffen die bioelektrischen Erscheinungen in Ruhe, bei mechanischen und Licht-Reizen und unter der Einwirkung bestimmter Pharmaca.

1. Als Versuchsmaterial diente die Ohrenqualle *Aurelia aurita* Lamarck, deren Schirm einen Durchmesser von 5—15 cm hat. Zur Fixierung wurden die Quallen in eine besonders angepaßte Büchse gebracht. Um den zu untersuchenden Randkörper unbeweglich über dem oberen Rand der Büchse in festgelegter Stellung zu erhalten, wurde der freie Raum zwischen der Wand der Büchse und dem Körper der Qualle mit in Seewasser getränkter Watte ausgefüllt. Dann wurde eine Mikroelektrode in den



Randkörper eingeführt. Der Durchmesser einer Sinneszelle in dem Randkörper der Meduse beträgt etwa  $5-10\ \mu$ , der der Spitze der Mikroelektrode betrug etwa  $10\ \mu$ . Wir konnten daher nicht mit dem Auftreten des Aktionspotentials nur einer Sinneszelle rechnen, sondern haben wohl meist von zwei oder drei benachbarten Sinneszellen abgeleitet. (Abb. 1.)

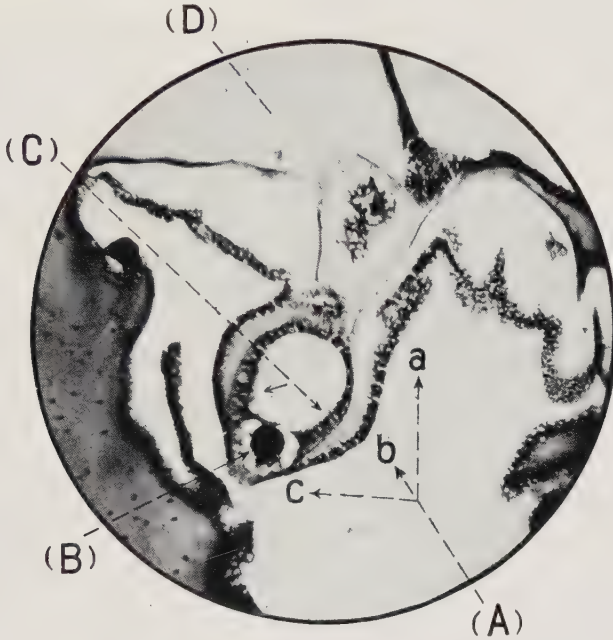


Abb. 1. Fixierter Randkörper von *Aurelia aurita* (150 $\times$ ). (A) a. Stielteil. (A) b. Mittelteil. (A) c. Spitzenteil. (B). Statolith. (C). Flimmer-Zylinderepithelzellen. (D). Körper-Gallerte.

## 2. Ergebnisse: Die im Ruhezustand von dem Randkörper ableitbaren Aktionspotentiale.

Mit Hilfe der von uns verwendeten Mikroelektroden von geringem Widerstand konnten wir im Ruhezustand des Randkörpers der Meduse Aktionspotentiale der Sinneszellen von einer Größenordnung von etwa 0,2 bis 2,5 mV ableiten. Abb. 2 gibt eine Übersicht über die vorkommenden Formen normaler Aktionspotentiale. Abb. 2 A<sup>1</sup> zeigt, daß bei dem am häufigsten auftretenden einfachen Aktionspotential nach einer raschen negativen Schwankung eine positive Welle folgt, die im Verlauf von etwa 0,3 sec langsam zur Isoelektrischen zurückkehrt. Wenn derartige einfache Aktionspotentiale aufeinanderfolgend erscheinen, so kann bei einem Intervall von insgesamt 1,3 sec jedes einzelne Aktionspotential noch unverändert die gleiche Wellenform aufweisen (Abb. 2 A<sup>2</sup>). Wird der zeitliche Abstand kürzer, dann greift, wie Abb. 2 A<sup>3</sup> u. 4 zeigen, das nachfolgende Aktionspotential in das vorausgehende ein. In diesem Falle kann die posi-

tive Welle des ersten Aktionspotentials völlig ausfallen und nach der negativen Erhebung des ersten sogleich eine zweite, dem folgenden Aktionspotential entsprechende negative Erhebung auftreten, der dann normalerweise die positive Welle nachfolgt. Der Abstand zwischen den beiden

Spitzenpotentialen kann dabei sehr gering werden.

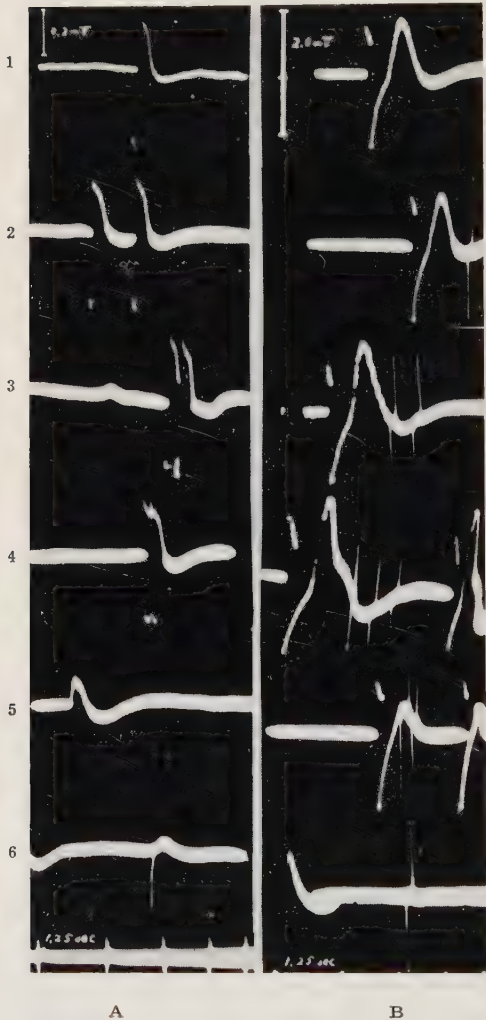


Abb. 2. (A) Normale Aktionspotentiale des Randkörpers im Ruhezustand. (B) Kompliziertere normale Aktionspotentiale des Randkörpers im Ruhezustand.

Nicht selten kommt es außerdem vor, daß ein Aktionspotential unter Ruhebedingungen aus einer weniger steilen, mehr wellenförmigen negativen und positiven Schwankung besteht (Abb. 2 A<sup>5</sup>). In anderen Fällen folgt auf eine sehr rasche positive Entladung (spike) eine langsame negative Welle. (Abb. 2 A<sup>6</sup>). Es sind aber auch unter Ruhebedingungen eine Reihe von komplizierteren Abläufen von Aktionspotentialen registriert worden (Abb. 2 B). So kann nach dem raschen Ablauf eines diphasischen Aktionspotentials noch eine zweite langsame negative Welle folgen (Abb. 2 B<sup>1</sup>). Diese nachfolgende langsame negative Welle kann ihrerseits noch wieder von einem oder mehreren diphasischen Spitzenpotentialen (spike) überlagert sein (Abb. 2 B<sup>2, 3, 4 u. 5</sup>). Auch isoliert können diphasische (positive und negative) Spitzenpotentiale vorkommen (Abb. 2 B<sup>6</sup>).

Wir können zur Zeit über die Ursachen dieser Mannigfaltigkeit der Aktionspotentiale unter den Bedingungen des Ruhezustandes der Sinneszellen noch gar keine Aussagen machen.

### 3. Die Aktionspotentiale bei Lichtreizen.

Durch die Anwendung von Lichtreizen können Frequenz und Form der im Ruhezustand auftretenden Aktionspotentiale erheblich verändert werden. Stets war die Wirkung beim Einsetzen eines Lichtreizes geringer als beim Aufhören desselben. Beim Beginn des Lichtreizes kam es zu einer

Steigerung der Frequenz der Aktionspotentiale (sowie auch zu einer Stimulation der Kontraktionen der Meduse). Beim Aufhören des Lichtreizes wurde die Frequenz der Aktionspotentiale noch weit stärker gesteigert. Diese Frequenzzunahme dauerte etwa 30 sec (beim Ausschalten des Lichtes nahmen auch Häufigkeit und Größe der Kontraktionen der Meduse wesentlich stärker zu als beim Einschalten des Lichtes). (Abb. 3.)

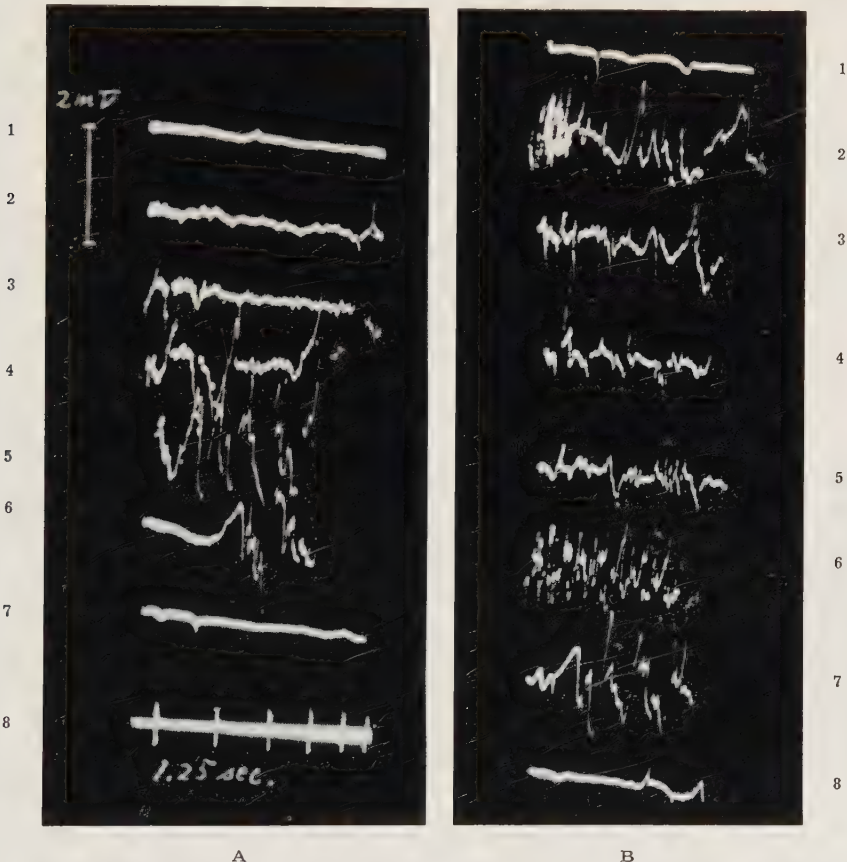


Abb. 3 A. 1, 2, 3: Die normalen Aktionspotentiale vor der Reizung. 4, 5, 6 zeigen Reizfolge-Aktionspotentiale bei Beginn eines Lichtreizes. 7 zeigt die Adaptation. Die Kurven sind fortlaufend zu lesen. 8: Zeitmarkierung.

Abb. 3 B. 1 zeigt die Reizfolge-Aktionspotentiale bei längerer Dauer des Lichtreizes (Adaptation). 2, 3, 4, 5, 6, 7 zeigen die Reizfolge-Aktionspotentiale bei Aufhören des Lichtreizes. 8 zeigt die Adaptation. Die Kurven sind fortlaufend zu lesen. Kurve (B) 1 schließt an Kurve (A) 7 an.

#### 4. Die Aktionspotentiale bei Strömungsreizen.

Weiterhin versuchten wir den Einfluß von Seewasser-Strömungen, die gegen den Randkörper gerichtet wurden, auf die Aktionspotentiale festzustellen. Die Wirkung war eine durchaus verschiedene je nach der Richtung der auf den Randkörper wirkenden Strömung. Die stärkste Wirkung wurde dann erzielt, wenn die Strömung von außen senkrecht auf den Schirmrand der Meduse (auf den Ort des Randkörpers) gerichtet war.



Sehr viel schwächer war die Wirkung bei einer tangential zum Schirmrand gerichteten Strömung. Die Wirkung auf die Frequenz der Aktionspotentiale war von dem Druck und der Einwirkungsdauer der Strömung abhängig und verhielt sich diesen gegenüber proportional. Dies galt bis zu einem maximalen Reizwert des Druckes bei etwa 200 mm H<sub>2</sub>O. Wenn die Einwirkungsdauer 20 sec überschritt, kam es zu keiner Frequenzsteigerung mehr, was wir für eine Adaptationserscheinung halten.

Wir machten ferner die interessante Beobachtung, daß bei Einwirkung der Strömung gegen einen bestimmten Randkörper auch der benachbarte Randkörper in ungefähr entsprechender Weise Reizfolge-Aktionspotentiale ergab. Diese „indirekten“ Reizfolge-Aktionspotentiale verhielten sich in ihrer Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Reizes durchaus entsprechend den von dem direkt gereizten Randkörper abgeleiteten.

Es sei noch besonders darauf hingewiesen, daß nach erfolgter Adaptation auch mehrfach hintereinander gegebene Reize durch keine Aktionspotentiale mehr beantwortet wurden. Im Zustand der Adaptation konnten die Sinneszellen zeitweise gar keine Aktionspotentiale liefern.

##### *5. Einfluß von Strychnin und Cocain auf die Aktionspotentiale.*

Es ist bekannt, daß bei der starken Erregung, die durch Strychnin in dem Nervensystem der verschiedensten Organismen hervorgerufen wird, besonders charakteristische Spitzenpotentiale (spikes) auftreten. Auch bei den Aktionspotentialen des Randkörpers von Aurelia tritt unter Strychnin eine Steigerung der Frequenz, verbunden mit Formveränderungen, auf. Auch die typischen Strychninspitzenpotentiale sind besonders häufig.

Es wurde außerdem versucht festzustellen, welchen Einfluß eine 10%ige Cocainlösung auf die durch eine Seewasserströmung ausgelösten Reizfolge-Aktionspotentiale hat. Nach einer Einwirkungsdauer der Cocainlösung von 20 min verminderte sich oder verschwand das Reizfolge-Aktionspotential. Die Nachentladungen nahmen allmählich ab, und zwar in zunehmendem Maße mit fortschreitender Dauer der Einwirkung der Cocainlösung.

Unsere Untersuchungen haben die schon durch die bloße Beobachtung bekannte Tatsache bestätigt, daß die Randkörper der Scyphomedusen Rezeptoren für mehr als eine Reizart enthalten. Schon die morphologische Struktur der Randkörper läßt erkennen, daß es sich hier in erster Linie um Stato-Rezeptoren handeln muß. Die am meisten auffällige Strukturform ist der an der Spitze des klöppelförmigen Organs befindliche Statolith, der von einem Flimmer-Zylinderepithel umgeben ist. Jede Bewegung des klöppelförmigen Organs führt offenbar zu einer Erregung der Stato-Rezeptoren. Eine Bewegung dieser Art kann zweifellos durch alle Lageänderungen des ganzen Tieres, die in irgendwelchen Ebenen des Raumes erfolgen, bewirkt werden. Ebenso können auch gegen den Schirmrand gerichtete Wasserströme wirken, vor allem wenn sie nicht tangential einwirken, sondern senkrecht auf den Schirmrand treffen.

Durch unsere Untersuchungen haben wir aber außerdem auch mit einer objektiven elektro-physiologischen Methode den Beweis erbracht, daß in dem Randkörper der Meduse eine Photoreception stattfindet. Die off-Reaktionen sind stets stärker als die on-Reaktionen. Sowohl bei Licht- wie auch bei Strömungsreizen zeigt sich relativ rasch die Erscheinung der Adaptation.

Soweit wir feststellen konnten, handelt es sich bei den für Licht- und den für Strömungsreizen empfindlichen Rezeptoren um Sinneszellen, die auch topographisch etwas verschieden lokalisiert sind.

### Zusammenfassung

Von den Sinneskörpern (Randkörpern) der Meduse *Aurelia aurita* wurden unter verschiedenen Bedingungen Aktionspotentiale abgeleitet. Im Ruhezustand ließen sich mehrere verschiedene Formen normaler Aktionspotentiale ableiten: Der einfachste Typ bestand aus einer raschen negativen und einer langsamen positiven Phase. Es fanden sich auch triphasische Aktionspotentiale, die aus einer raschen negativen, einer raschen positiven und einer langsamen negativen Phase zusammengesetzt waren. In diesem Falle konnten während der langsamen Welle noch 1—3 sehr rasche diphasische Spitzenpotentiale (spikes) auftreten. Derartige Spitzenpotentiale konnten auch isoliert vorkommen. Häufig wurden bei sehr rascher Impulsfolge auch verschiedene Stadien der Überlagerung des absteigenden Schenkels des einen und des aufsteigenden des folgenden Aktionspotentials gefunden. Diese Aktionspotentiale hatten eine Größe von etwa 0,2—2,5 mV.

Unter der Einwirkung von Lichtreizen kam es jeweils im Beginn zu einer deutlichen Frequenzsteigerung der Aktionspotentiale, beim Aufhören des Lichtreizes jedoch zu einer noch wesentlich stärkeren Zunahme der Frequenz. Auch die Kontraktionen der Meduse werden durch das Ausschalten des Lichtes stärker stimuliert als durch das Einschalten. Auch durch eine Reizung des Randkörpers mit Strömungsreizen konnte eine dem Druck und der Einwirkungsdauer der Strömung proportionale Frequenzsteigerung erzielt werden. Maximalen Reizwert besaß ein Druck von 200 mm H<sub>2</sub>O und einer Einwirkungsdauer von 20 sec. Von diesem Zeitwert ab zeigt sich sowohl bei Licht- wie auch bei Strömungsreizen die bis zu einer völligen Reaktionslosigkeit gehende Erscheinung der Adaptation. Bei den Reaktionen auf Licht- und Strömungsreize sind offenbar (auch topographisch verschieden lokalisierte) verschiedene Rezeptoren beteiligt.

Strychnin bewirkt eine Frequenzsteigerung der Aktionspotentiale, Cocain hemmt die Wirkung von Strömungsreizen in erheblichem Grade.

### Summary

Under various conditions action potentials have been derived from the sense organs (margin bodies) of the medusa *Aurelia aurita*.

### Résumé

Des organes sensoriels (organes marginaux) de la méduse *aurelia aurita* on a dérivé des potentiels d'action dans des conditions différentes.

### Schrifttum

1 Adrian, E. D., The Basis of Sensation, London 1949 — 2 Cohen, M. J., Y. Katsuki und Th. H. Bullock, *Experientia* **9** (1953): 434 — 3 Davisson, D. J. und L. H. Germer, *Nature* **119** (1927): 558 — 4 Dusser de Barenne, J. G. und W. S. McCulloch, *J. Neurol. Psychiat.* **162** (1938): 815 — 5 Gray, J. A. B. und M. Sato,

- J. Physiol. **122** (1953): 610 — 6 Hatakeyama, I., Jap. J. Physiol. **16** (1954): 124 — 7 Horridge, A., Nature **171** (1953): 400 — 8 Katuki, Y., S. Yoshino und J. Chen, Jap. J. Physiol. **1** (1950): 87; **1** (1950): 179 — 9 Kinoshita, H., Jap. J. Zoology **9** (1941): 209 — 10 Prosser, C. L., Comparative Animal Physiology. 1950 — 11 Tomita, T. und A. Funaishi, J. Neurophysiol. **15** (1952): 75 — 12 Winterstein, H., Handbuch der vergleichenden Physiologie, Bd. 4, 1913 — 13 Yamashita, T., Oto-Rhino-Laryng. Clin. (Kioto) **47** (1954): 387 — 14 ders., ebda. **49** (1956): 83 — 15 Zotterman, Y., Annual Rev. Physiol. **15** (1953): 357



*Aus dem Physiologischen Institut der Universität Münster/Westf.  
(Direktor: Prof. Dr. E. Schütz)*

## **Über sich fortpflanzende Kontrakturen an Skelettmuskelfasern unter dem Einfluß von Monojodessigsäure-NaCN-Gemischen**

Von K. E. Rothschuh

Mit 3 Abbildungen

Eingegangen am 27. August 1956

### *Einleitung*

Von *Ling* und *Gerard*<sup>3</sup>, *Fleckenstein* und Mitarb.<sup>1</sup>, sowie *Sadow* und *Schneyer*<sup>8</sup> sind die Wirkungen von Stoffwechselhemmern wie Monojodessigsäure (= MJE), NaCN usw. auf das Ruhepotential des Skelettmuskels und auf den kontraktile Apparat nach verschiedenen Richtungen durchuntersucht worden. Sie machen in der Regel *Depolarisation* und *Kontraktur*. Bleiben wir bei *S. Gassers* (1930) Definition, daß es sich bei einer Kontraktur um einen reversiblen, nicht fortgeleiteten, am Auslösungsort relativ lange anhaltenden Verkürzungszustand des kontraktile Apparates handelt, dann würden wir mit *Sadow*<sup>8</sup> besser von „Rigor“ sprechen, denn reversibel ist z. B. die Monojodessigsäurekontraktur nicht. Aber die begriffliche Festlegung macht erneute Schwierigkeiten angesichts der kürzlich von uns beobachteten Erscheinung, daß es unter Monojodessigsäure-NaCN-Einwirkung zu Kontrakturen kommt, welche von verletzten Stellen der Skelettmuskelfasern ausgehen und sich allmählich über längere Faserabschnitte ausbreiten. Hier haben wir es also mit sich fortpflanzenden Kontrakturen zu tun, welche man als „Wanderkontrakturen“, jedenfalls als „Kontrakturen“ bezeichnen möchte, obgleich sie in 2 Punkten der Gasserschen Definition der Kontraktur nicht genügen. Aber nach dem histologischen Bilde der Querstreifung handelt es sich dabei um den Übergang vom Zustand der Erschlaffung in den einer Dauerverkürzung unter Vermittlung eines Fortpflanzungsmechanismus. Es soll im Folgenden nicht mehr als ein kurzer Bericht über dieses eigenartige Phänomen der sich fortpflanzenden Kontraktur gegeben werden.

## Methodik

Wir arbeiteten mit isolierten Skelettmuskelfasern aus der langen Oberschenkelmuskulatur des Frosches (*Rana temporaria*), besonders aus dem *M. adductor magnus*. Die Fasern werden durch Zerzupfen gewonnen und auf dem Objektträger in die Versuchslösung eingebettet. Die Beobachtung erfolgt mit Hilfe der Hellfeldmikroskopie und mit der Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit dem Vitalfarbstoff Akridin-Orange. Über die Methode wurde andernorts näher berichtet (Rothschuh <sup>4</sup>). Zur Stoffwechselhemmung verwendeten wir eine von Ling und Gerard <sup>3</sup> angegebene Mischung von 0,005 M Monojodessigsäure und 0,01 M NaCN (= 0,09 g Monojodessigsäure + 0,05 g NaCN) in 100 cm<sup>3</sup> normaler Ringerlösung.

## Beobachtungen

Von jeder durch einen Querschnitt verletzten Skelettmuskelfaser, die sich in einem leitenden Elektrolytmilieu, also z. B. in Ringerlösung, befindet, geht vom Orte der Verletzung ein langsam fortschreitender Prozeß der strukturellen Desorganisation aus (Rothschuh <sup>4</sup>), der in normaler Ringerlösung eine Geschwindigkeit von c. 20  $\mu$ /min, in Ca-reichen Lösungen von 100  $\mu$ /min und mehr erreichen kann <sup>5</sup>.

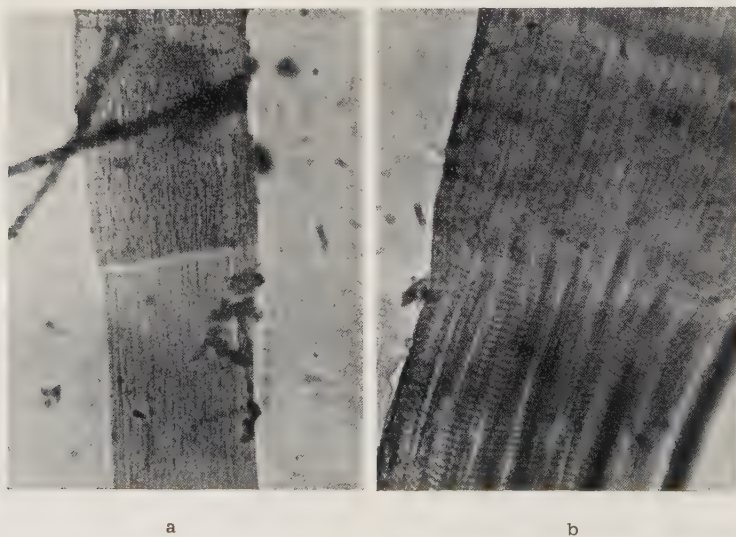


Abb. 1. Einzelne Skelettmuskelfasern vom Frosch. 10 min im Monojodessigsäure-NaCN-Gemisch. Eine Wanderkontraktur breitet sich von oben nach unten über die Faser aus. a) Oberer dunklerer Faserabschnitt in Kontraktur, unterer hellerer Abschnitt noch erschlaft. Obj. 10; Ok. 10 (32/18).

Abb. 1. b) Oberer Teil des Bildes mit Kontraktur. In der Grenzzone zum unteren, noch erschlaften Faserstück sieht man einen allmählichen Übergang von der normalen Querstreifung über engere Querstreifung bis zu einer bei dieser Vergrößerung nicht mehr sichtbaren, außerordentlich engen Querstreifung. Obj. 45; Ok. 10 (33/33).

Bringt man solche Fasern in das obengenannte Gemisch von Monojodessigsäure + NaCN in Ringerlösung hinein, so beobachtet man in den ersten 5—10 min nur das gewohnte Bild. Nach etwa 10 min aber beginnt sich der träge Vorgang der strukturellen Desorganisation zu beschleunigen und zwar in einem unerwarteten Ausmaß. Mit einer Fortpflanzungsgeschwindigkeit von 200—250  $\mu$ /min breitet sich, von den verletzten Faser-

enden ausgehend, ein Prozeß kontinuierlich aus, der Faserabschnitt nach Faserabschnitt ergreift und das Querstreifungsbild der erschlafften Faser in das enggestreifte Bild der kontrakturierten Faser verwandelt. Dabei wird die kontrakturierte Zone gleichzeitig kürzer und etwas dicker.

Die Abb. 1 a zeigt bei Hellfeldbeobachtung eine Faser, die von oben her von der Kontrakturwelle überlaufen wird. Der dunklere Abschnitt ist schon in Kontraktur, der untere hellere noch erschlafft. Betrachtet man eine solche Übergangszone bei stärkerer Vergrößerung, so sieht man (Abb. 1 b), daß in der Grenzzone ein allmählicher Übergang von der breiten

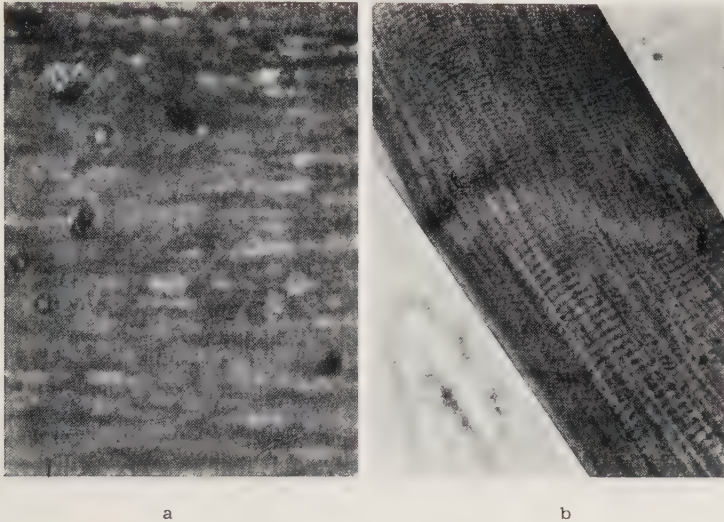


Abb. 2. Einzelne Skelettmuskelfasern vom Frosch. 10 min im Monojodessigsäure-NaCN-Gemisch. a) Zone im Zustande der Kontraktur. Ganz enge Querstreifung. „Körnige“ Trübung ohne Zerstörung der Faserstruktur. Obj. 45; Ok. 10. Stark nachvergrößert (30/42). Abb. 2. b) Übergangszone. Oben kontrakturiertes Abschn., unten erschlaffter Abschnitt. Obj. 45; Ok. 10 (32/16).

Querstreifung der erschlafften Fasern zu immer engerer Querstreifung erfolgt, bevor das Querstreifenbild so eng wird, daß es bei dieser Vergrößerung nicht mehr sichtbar ist. Bei noch stärkerer Vergrößerung (Abb. 2 a) läßt sich aber erkennen, daß die Querstreifung erhalten geblieben ist, daß aber in der Faser eine Menge von Trübungen und körnigen Einschlüssen entstanden sind, die der frischen Faser fehlen. In manchen Fällen kommt dieser sich fortpflanzende Kontrakturprozeß unter allmählicher Verengung zum Stillstand, dann lassen sich Bilder wie in Abb. 2 b gewinnen. Dort ist die Kontrakturwelle in der Mitte des Bildes zum Stehen gekommen. Oben ist die Querstreifung sehr eng und unten normal weit. Die gleiche Faserstrecke enthält oben im Kontrakturbezirk die doppelte Anzahl von Querstreifen wie im unteren erschlafften Bezirk. Die Faser ist also um c. 50 % verkürzt.

Beobachtet man dann solche Fasern in einem Monojodessigsäure-NaCN-Gemisch in Ringerlösung mit 1 : 10 000 Akridinorange-Zusatz im UV-Licht



des Fluoreszenzmikroskops, so zeigt die kontrakturierte Zone eine hellgelbe Fluoreszenz, die jeweils im Augenblick des Übergangs in Kontraktur auftritt. Im Schwarz-Weißbild ist der gelbfluoreszierende Faserabschnitt hell gegenüber der kaum fluoreszierenden dunklen, erschlafften, intakten Faserzone (Abb. 3 a). In der kontrakturierten Zone liegen die Kerne abgerundet dicht gepackt nebeneinander, in der erschlafften Zone aber liegen die langgestreckten Kerne weit auseinander. Eine derart starke Aufnahme von Akridinorange erfolgt nur bei Geweben, die eine starke Desorganisation ihrer Proteinstrukturen erleiden. *S. Strugger*<sup>9</sup> hat daher die Methode

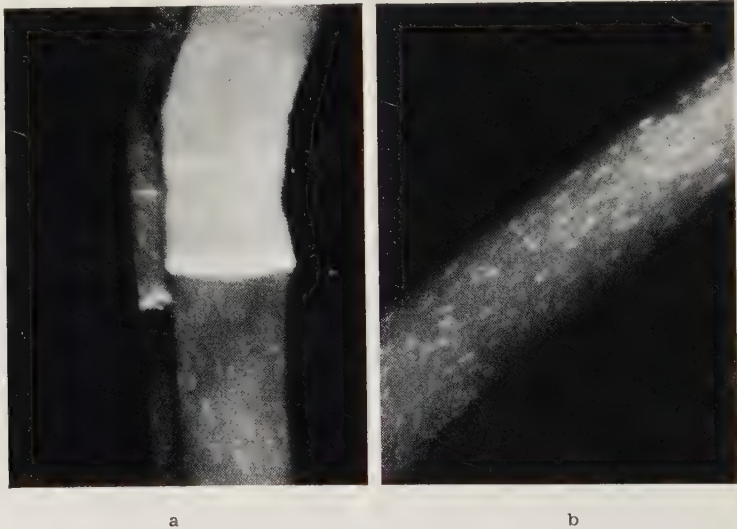


Abb. 3. Fluoreszenzmikroskopisches Bild von Skelettmuskelfasern des Frosches. a) Im Monojodessigsäure-NaCN-Gemisch von oben nach unten sich ausbreitende Kontraktur. Kontrakturiertes oberer Faserabschnitt durch starke Sekundärfluoreszenz hell, unterer Faserabschnitt erschlafft, dunkel. Obj. 10. Ok. 8 (35/24).

Abb. 3. b) In 2% KCl in Ringerlösung keine verstärkte Fluoreszenz des Faserplasmas, nur die Kerne sind gegenüber der Norm verdickt, verkürzt, aufgetrieben. Obj. 10. Ok. 10 (32/41).

zur Unterscheidung lebenden und toten Protoplasmas empfohlen. Demgegenüber zeigen Muskelfasern, die sich in einer reversiblen K-Kontraktur (Abb. 3 b) befinden, keine verstärkte Akridinorangeaufnahme und Fluoreszenz, trotz einer nachweislichen Engerstellung der Querstreifung, also einer Verkürzung des kontraktilen Apparates und trotz bestehender Depolarisation. Das beweist, daß die sich fortpflanzenden Kontrakturen im Monojodessigsäure + NaCN-Gemisch eine schwere Faserdenaturierung darstellen. Übrigens nehmen isolierte Muskelfasern, die durch 1—5% Urethan in Ringerlösung schnell in allgemeine Kontraktur verfallen, auch relativ reichlich Akridinorange auf. Es scheint also, daß aus dem Akridin-Orange-Fluoreszenzverfahren eine geeignete Methode zur Trennung von irreversiblen „Schädigungskontrakturen“ und reversiblen Kontrakturen zu gewinnen ist.

*Besprechung der Beobachtungen*

Es ist durch viele, teils ältere, teils neuere Untersuchungen geklärt, daß Monojodessigsäure vorwiegend den Prozeß der Glykolyse hemmt, daß NaCN aber das Warburgsche Atmungsferment blockiert und damit die Oxydation lahm legt. Wirken beide Mittel gleichzeitig auf eine Muskelfaser ein, so kommt es zur Aktivierung des kontraktilellen Apparates (nach Sandow und Schneyer<sup>8</sup>), vielleicht ist sie auch nicht mehr in der Lage, ihren zur Strukturhaltung und Polarisation erforderlichen Energiebedarf freizusetzen. Ob die Ruheladung, die gleichzeitig dabei verloren geht, ein primäres oder sekundäres Glied ist, scheint mir noch nicht ganz geklärt. Fleckenstein<sup>2</sup> nimmt an, daß die Faser in Kontraktur geht, sobald sie ihr Grenzflächenpotential, hier also durch die Stoffwechselinsuffizienz, einbüßt. Doch ist nicht zu verkennen, daß in anderen Fällen z. B. im Falle der K-Kontraktur, der Verlust der Ruheladung, also die „Depolarisation“ ohne wesentliche Strukturbeeinträchtigung erfolgt, während bei unseren fortgepflanzten Depolarisations-Kontraktur-Zuständen unter MJE + NaCN ausweislich des fluoreszenzmikroskopischen Bildes eine schwere Proteindesorganisation (L. V. Heilbrunn<sup>10</sup>) vorliegen muß. Immerhin spielen elektrische Prozesse in dem Fortpflanzungsprozeß wahrscheinlich eine beträchtliche Rolle, denn wie die Analyse der „langsam fortschreitenden Desorganisationsvorgänge“ (Rothschuh<sup>5, 6</sup>) inzwischen ergeben hat, ist für das Fortschreiten die Entladung mit ihrer Verletzungsströmung ein sehr wesentliches Glied in der Kette der kausalen Zusammenhänge. Vermutlich beeinträchtigt das MJE-NaCN-Gemisch einmal die Membranladung und labilisiert außerdem die Struktur des kontraktilellen Apparates, so daß die Depolarisation hier gleichzeitig Ursache- und Folglied im Prozeß der Desorganisation, der Kontraktur und der Fortpflanzung ist. Über diese Probleme der Kopplung von Membrangeschehen und kontraktilem Geschehen wurde andernorts (Rothschuh<sup>7</sup>) eingehend berichtet.

*Zusammenfassung*

Bringt man isolierte Skelettmuskelfasern in ein Gemisch von 0,005 M Monojodessigsäure und 0,01 M NaCN in Ringerlösung, so entwickeln sich etwa 10 min nach der Einbettung sich fortplanzende Kontrakturen, welche von den verletzten Querschnitten der Fasern ihren Ausgangspunkt nehmen und mit einer Geschwindigkeit von 200–250  $\mu$ /min die Faser Stück für Stück in den Zustand enger Querstreifung mit Verkürzung überführen. Die kontrakturierten Faserabschnitte nehmen dabei reichlich Akridinorange auf, so daß sie im fluoreszenzmikroskopischen Bilde bei UV-Beleuchtung stark gelb fluoreszieren. Das weist auf tiefgreifende Strukturalterationen hin. Fasern im Zustand der K-Kontraktur zeigen nicht diese Gelbfluoreszenz, obgleich in beiden Fällen eine Depolarisation nachzuweisen ist.

*Summary*

From damaged cross-sections of skeleton-muscle fibres suspended in Ringer's solution containing .005 mol monoiodoacetic acid plus .01 mol sodium cyanide, processes of contractions start and proceed all over the fiber with a velocity of approximately 200 to 250  $\mu$  per minute. These contractions result in a narrow transverse striation of the fiber where contraction, depolarization and alteration of the structure are present at the same time.

*Résumé*

Les fibres musculaires du squelette dans 0,005 mol. d'acide acétique monoionique + 0,01 mol NaCN en solution Ringer subissent des contractions à partir de la section blessée qui se transmettent aux fibres avec une vitesse de 200 à 250  $\mu$  à la minute et donnent à celles-ci une structure serrée transversale. Ici on trouve simultanément des contractions, une dépolarisation et une altération de structure.

**Schrifttum**

- 1 *Fleckenstein, A., W. Brose, H. J. Canis u. A. Förderer*, Arch. exper. Path. u. Pharm. **204** (1950): 235 — 2 *Fleckenstein, A.*, Der Kalium-Natriumaustausch, Göttingen-Berlin-Heidelberg 1955 — 3 *Ling, G. u. R. W. Gerard*, J. Cellul. Comp. Physiol. **34** (1949): 413 — 4 *Rothschuh, K. E.*, Pflügers Arch. **260** (1955): 437 — 5 *ders.*, ebda. **261** (1955): 557 — 6 *ders.*, ebda. **263** (1956): 589 — 7 *ders.*, Klin. Wschr. **1956**: 1049 — 8 *Sandow, A. u. Ch. A. Schneyer*, J. Cellul. Comp. Physiol. **45** (1955): 131 — 9 *Strugger, S.*, Fluoreszenzmikroskopie u. Mikrobiologie, Hannover 1949 — 10 *Heilbrunn, L. V.*, The dynamics of living protoplasm, New York 1956



*Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. A. W. Forst)*

## **Über die Verminderung des kritischen Hämolysevolumens von Pferdeerythrocyten durch Gerbstoffe**

*Von Albert Herz*

Mit 8 Abbildungen

Eingegangen am 1. September 1956

Verminderte Durchlässigkeit und herabgesetzte Dehnbarkeit sind Charakteristica adstringierter Gewebe. Die Ursache dieser Funktionsveränderung wird in elektiven stofflichen Beziehungen der Adstringentien zu faserigen und membranösen Strukturen des Bindegewebes gesehen (*Heubner*). Auch an Einzelzellen, insbesondere Erythrocyten, wurden die Wirkungen von Adstringentien studiert (Zusammenstellung der älteren Befunde z. B. für Tannin bei *Bohlmann*). Abgesehen von einer Durchlässigkeitsverminderung für gelöste Substanzen wie Glycerin (*Wilbrandt* und *Wyss*) und für Anionen (*Jacobs* u. Mitarb.), sind die an Einzelzellen unter der Einwirkung pflanzlicher Gerbstoffe erhobenen Befunde meist wenig charakteristisch. So hat sich die als Permeationsverminderung gedeutete hochgradige Hämolysehemmung durch Tannin als Scheineffekt erwiesen (*Wilbrandt* und *Heimann*). Im folgenden wird nun eine Verminderung des kritischen Hämolysevolumens von Pferdeerythrocyten durch Gerbstoffe beschrieben; sie ist Ausdruck einer Membranveränderung, die in Parallele zu der verminderten Dehnbarkeit adstringierten Gewebes gestellt werden kann.

Da in den vorliegenden Untersuchungen z. T. ausgesprochen technische Gerbstoffe zur Anwendung kamen, wird vor allem von „Gerbung“ gesprochen. Auf die weitgehende Übereinstimmung des Begriffes Gerbung mit dem der Adstriktion ist wiederholt, z. B. von *Heubner* hingewiesen worden.

### *Methodik*

**Verwendete Gerbstoffe:** Tannin reinst (Merck, Darmstadt); d-Catechin, wasserfrei, Smp. 170° (Th. Schuchardt, München); synthetische Gerbstoffe: Tanigan extra GR (Bayer, Leverkusen), Irgatan B (Geigy, Grenzach), Basyntan extra J (BASF, Ludwigshafen) \*. Ferner gerbstoffhaltige Drogen aus

\* Die synthetischen Gerbstoffe wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Grassmann, Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, Regensburg, zur Verfügung gestellt.

der Institutssammlung: Catechu, Cortex Quercus, Radix Ratanhiae; die letzteren wurden im Multimix zerkleinert und zwei Tage mit der zehnfachen Menge Wasser bei Zimmertemperatur maceriert. Die Substanzen wurden für die Versuche in isotonem Phosphatpuffer (9 Teile NaCl 165 mM, 1 Teil Natriumphosphatpuffergemisch nach Mural,  $P_H$  7,3) gelöst; bei den stärker sauren synthetischen Gerbstoffen war die Einstellung auf  $P_H$  7,3 mit Natronlauge erforderlich.

**Bestimmung der osmotischen Resistenz:** Defibriniertes Pferdeblut — es war auch nach mehrtägigem Stehen bei 4° C noch brauchbar — wurde 4-mal mit isotonem Phosphatpuffer gewaschen. 1 Teil gewaschenes Blut wurde mit 10 Teilen isotonem Phosphatpuffer vermischt und im Wasserbad bei 38° C inkubiert; zur Aufstellung der Resistenzreihen wurde in bestimmten Abständen je 1 ccm Blutsuspension zu 10 ccm der abgestuften Phosphatpufferverdünnungen gegeben und nach 10 Minuten abzentrifugiert; 1 ccm der überstehenden Hämoglobininlösung wurde mit 5 ccm Phosphatpuffer M/15 nach Sörensen,  $P_H$  6, 8, verdünnt, sodann, zur Überprüfung des Hämoglobins in Methämoglobin, 1 Tropfen 0,2 %ige  $K_3Fe(CN)_6$ -Lösung dazugegeben und anschließend mit dem Photometer Eppendorf bei 405 m $\mu$  das Methämoglobin bestimmt.

**Alkalibestimmungen:** Je 10 ccm Blutsuspension wurden zentrifugiert und das Überstehende abgehoben. Die Ansätze für die Natriumbestimmung wurden 1-mal mit isotoner KCl-Lösung gewaschen; der Erythrocytenbrei wurde mit Aqua dest. auf 10 ccm aufgefüllt, je 2 ccm des Hämolysats wurden in Platintiegeln bei 480° C verascht. Die Natrium- und Kaliumbestimmung erfolgte mit dem Beckman-Flammenspektrophotometer.

**Hämatokritbestimmungen:** Geeichte Leukocytenpipetten, die mit einer geeigneten Halterungsvorrichtung versehen waren, wurden, nach Füllung mit der Blutsuspension, 30 Minuten bei 3,6.10<sup>3</sup> g zentrifugiert. Da in den Blutsuspensionen eine Verdünnung des Blutes von 1 : 10 vorlag und bei den Pipetten das vorgesehene Mischungsverhältnis ebenfalls 1 : 10 betrug, konnte das Blutvolumen unmittelbar abgelesen werden.

**Peroxydasepräparation:** Peroxydase wurde aus Meerrettich nach der Methode von Keilin und Mann gewonnen; die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach Willstätter und Stoll; verschiedene Chargen wiesen eine Purpurogallinzahl zwischen 10 und 30 auf. Mit diesem Ferment erfolgte die Oxydation von d-Catechin; zu den 0,01—0,1 %igen Lösungen von d-Catechin wurde je 100 ccm, 1 ccm 0,3 %ige  $H_2O_2$ -Lösung, sowie Ferment — etwa einer Purpurogallinzahl vom 1—5 entsprechend — gegeben. Nach 5—15 Minuten Stehen bei 38° C wurde die zunächst farblose, nun kräftige goldbraun gewordene Lösung, zur Vertreibung des  $H_2O_2$  kurz erhitzt und unmittelbar danach für die Versuche verwendet.

## Ergebnisse

### I. Die Resistenzverminderung:

Die gemeinsame Wirkung aller untersuchten gerbstoffartigen Substanzen war eine Verminderung der osmotischen Resistenz der Pferdeerythrocyten.

1. **Tannin:** Die folgenden beiden Abbildungen geben die Resistenzverminderung durch 50 mg% Tannin wieder.

Die anfänglich annähernd parallele Verschiebung der Resistenzkurven nach der Seite zeigt, daß die Erythrocyten etwa gleichmäßig an der Resistenzverminderung teilnehmen; mit fortschreitender Resistenzabnahme kommt es zu deutlicher Abschrägung der Resistenzkurve; dem liegt ent-

weder eine stärkere Streuung oder eine nicht-osmotische Hämolysekomponente zugrunde. Abb. 1 b veranschaulicht den schnellen Eintritt der Wirkung; diese verlangsamt sich alsbald, gelangt aber nicht zum Stillstand.

Abb. 1 a. Verminderung der osmotischen Resistenz von Pferdeerythrocyten durch 50 mg% Tannin; Verschiebung der Resistenzkurve nach der Seite mit zunehmender Inkubationszeit. (Die Isotoniewerte sind um den Salzgehalt der zugesetzten Blutkörperchensuspension nicht korrigiert; dies gilt auch für Abb. 1 b und 8.)

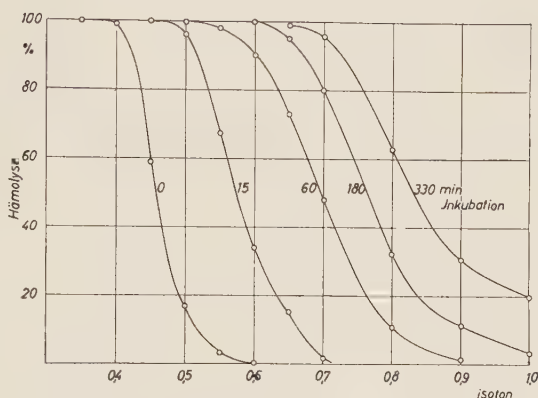
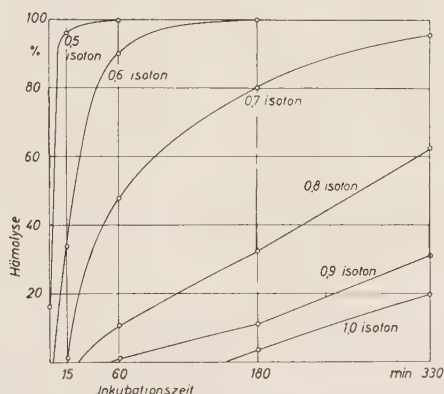


Abb. 1 b. Zeitlicher Verlauf der Resistenzverminderung des in Abb. 1 a wiedergegebenen Versuches mit 50 mg% Tannin.



Die folgende Abb. 2 zeigt die Wirkung verschiedener Tanninkonzentrationen. Hierbei ist als Ordinate das scheinbare Schwellungsvolumen  $V'$  aufgetragen; dieses berechnet sich nach dem Van't Hoff'schen Gesetz aus der Verschiebung der Resistenzkurven nach der Formel  $V' = C_2/C_1$  ( $C_1$  = Kochsalzverdünnung [Isotonie = 1] bei der die Ausgangsresistenzkurve eine 50 %ige Hämolyse erreicht;  $C_2$  = der entsprechende Wert der verschobenen Resistenzkurve). Auch bei Resistenzverschiebungen, denen keine Schwellung der Erythrocyten zugrunde liegt, ermöglicht die Berechnung des scheinbaren Schwellungsvolumens  $V'$  eine übersichtliche Wiedergabe der Ergebnisse.

Bei den kleinen Tanninkonzentrationen kommt die Resistenzverschiebung schnell zu einem annähernden Stillstand, während diese bei höheren Konzentrationen bis zur Hämolyse fortschreitet.

2. d - Catechin: d-Catechin ist ohne deutlichen Einfluß auf die osmotische Resistenz. Dagegen bewirkt es nach fermentativer Oxydation mit



Meerrettichperoxydase und anschließend kurzen Aufkochen eine starke Resistenzverminderung. Dies zeigt Abb. 3.

Auch bei hohen Konzentrationen gelangt die Resistenzverschiebung weitgehend zum Stillstand und schreitet nicht bis zur Hämolyse fort. Nach der Behandlung der Catechinlösung mit Ferment wurde in der Regel noch kurz erhitzt, um das nicht verbrauchte  $H_2O_2$  zu vertreiben; wurde dies unterlassen, so war die Resistenzverminderung nur gering und setzte sehr langsam ein. (Die mit der Oxydation des Catechins und dessen Übergang in hochmolekulare Körper mit gerberischen Eigenschaften zusammenhängenden Fragen werden an anderer Stelle ausführlich erörtert.)

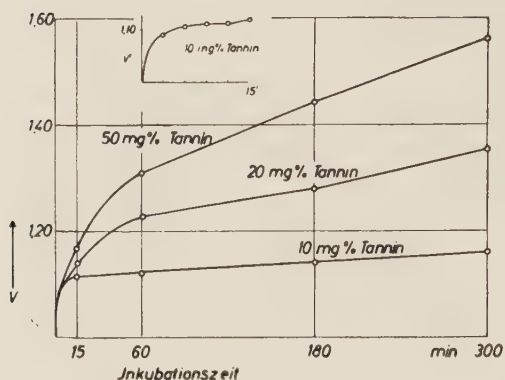


Abb. 2. Scheinbares Schwellungsvolumen (näheres siehe Text) bei verschiedenen Tanninkonzentrationen; die Einsatzfigur gibt den zeitlichen Verlauf bei 10 mg% Tannin in den ersten Versuchsminuten wieder.

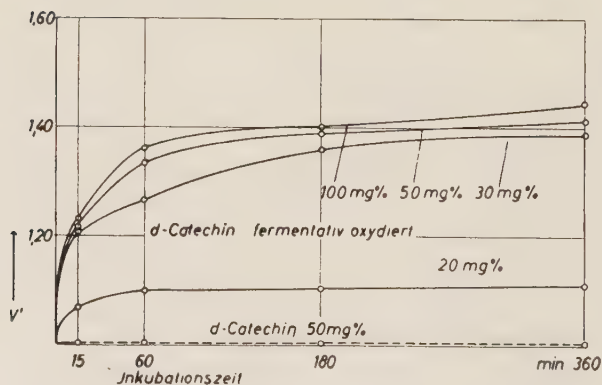


Abb. 3. Scheinbares Schwellungsvolumen von Pferdeerythrocyten nach Einwirkung fermentativ oxydierter d-Catechins in Vergleich zu unverändertem d-Catechin.

3. Synthetische Gerbstoffe: Bei den hier verwandten synthetischen Gerbstoffen handelt es sich um höhermolekulare Kondensationsprodukte einfacherer aromatischer Verbindungen mit saurem Charakter und semikolloider oder kolloider Wasserlöslichkeit. Genaueres über die sie aufbauenden, meist phenolischen Bausteine und die Art der Verknüpfung der Kerne bei den einzelnen Produkten wird von den Herstellerfirmen meist nicht bekanntgegeben. Abb. 4 zeigt die Wirkung des Gerbstoffes Tanigan extra GR.

Tanigan extra GR bewirkt eine starke, sehr schnell einsetzende Resistenzverschiebung, die bei den kleinen Konzentrationen vollkommen zum Stillstand gelangt. Die weiterhin geprüften synthetischen Gerbstoffe, Basyntan extra J und Irgatan B, verhielten sich sehr ähnlich.

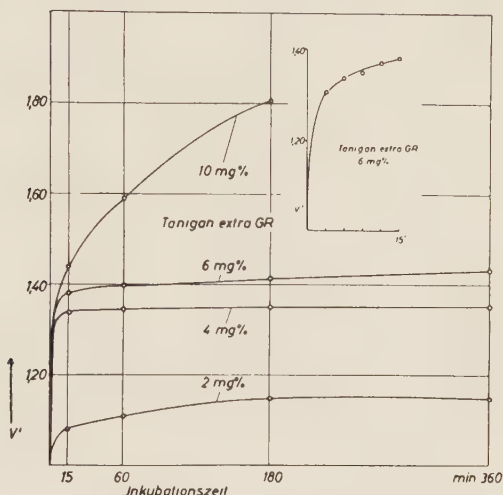


Abb. 4. Scheinbares Schwellungsvolumen von Pferdeerythrocyten nach Einwirkung verschiedener Dosen von Tanigan extra GR; die Einsatzfigur gibt den zeitlichen Verlauf bei 6 mg% in den ersten Versuchsminuten wieder.

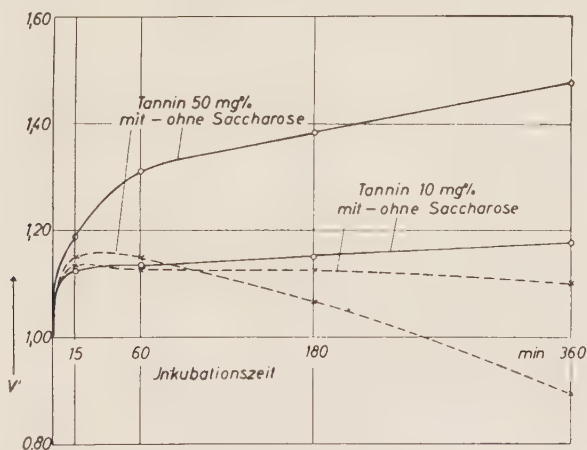


Abb. 5. Scheinbares Schwellungsvolumen von Pferdeerythrocyten bei verschiedenen Tannindosen in isotonem Phosphatpuffer, bzw. einer isotonen Lösung aus 3 Teilen Saccharose und 1 Teil Phosphatpuffer.

## II. Die Natur der Resistenzverschiebung:

Als Ursache der seitlichen Verschiebung der Resistenzkurven kommt entweder kolloid-osmotische Hämolyse oder eine Verminderung des kritischen Hämolysevolumens der Erythrocyten in Frage. Der beobachtete zeitliche Verlauf macht letzteres wahrscheinlich, wenn auch der zum Teil unvollkommene Stillstand der Resistenzverschiebung an die Beteiligung eines kolloid-osmotischen Mechanismus denken läßt. Zur Abgrenzung dieser beiden Möglichkeiten wurde zunächst der Kompensationstest mit Saccharose (Wilbrandt 1948) angewandt.

1. **Kompensationstest:** Hierbei wird der kolloid-osmotische Druck des Hämoglobins in der Zelle durch gewöhnlich nicht permeierende Saccharose in der Suspensionslösung ausgeglichen. Die Abb. 5 zeigt das Ergebnis bei verschiedenen Tannindosen.

Die Resistenzverschiebung während der ersten Versuchsminuten ist in den Ansätzen mit und ohne Saccharose annähernd gleich; bei weiterem Fortschreiten des Versuches verringert sie sich in den zuckerhaltigen Tannin-Ansätzen wieder, bei 50 mg $\%$  Tannin in viel stärkerem Maße als bei 10 mg $\%$ . Dieses legt den Schluß nahe, daß die anfängliche, schnell einsetzende Resistenzverschiebung auf einer Verminderung des kritischen Hämolysevolumens beruht, das weitere Fortschreiten derselben aber durch eine Erhöhung der Kationenpermeabilität bedingt ist. Eine solche führt, bedingt durch den kolloid-osmotischen Druck des Hämoglobins, zu kolloid-osmotischer Hämolyse.

In den saccharosehaltigen Ansätzen dagegen wird der kolloid-osmotische Druck des Hämoglobins durch den des nicht permeierenden Zuckers ausgeglichen, oder, wie bei der hier angewandten hohen Saccharosekonzentration, sogar überkompensiert, so daß es zu Schrumpfung der Zellen und damit wieder zu Erhöhung der osmotischen Resistenz kommt. Das Ausbleiben einer Hämolyse in den saccharosehaltigen Tanninansätzen zeigt auch, daß die Abflachung der Resistenzkurven im späteren Versuchsverlauf (siehe Abb. 1 a) durch Streuung und nicht durch eine verdeckte nicht-osmotische Hämolyse bedingt ist. (Geringfügige, 1—2 % kaum überschreitende nicht-osmotische Hämolysen sollen hier unberücksichtigt bleiben.) Abb. 6 gibt einen Kompensationsversuch mit Tanigan extra GR wieder:

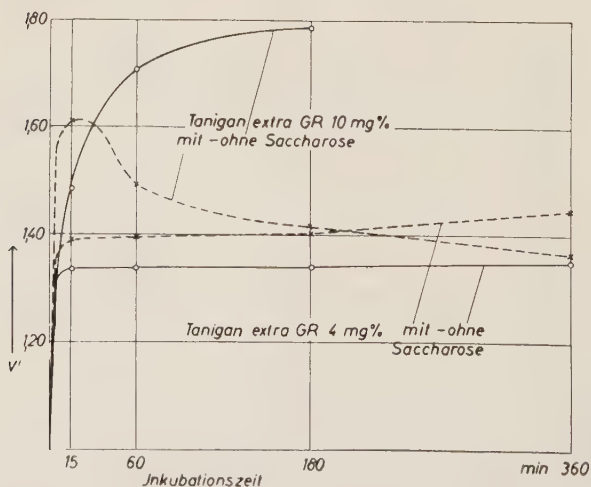


Abb. 6. Scheinbares Schwellungsvolumen von Pferdeerythrocyten nach Einwirkung verschiedener Dosen des synthetischen Gerbstoffes Tanigan extra GR in isotoner Phosphatpufferlösung, bzw. einer isotonen Lösung aus 3 Teilen Saccharose und 1 Teil Phosphatpuffer.

Der Kompensationstest zeigt, daß an der ausgeprägten Resistenzverschiebung durch 4 mg $\%$  Tanigan keine kolloid-osmotische Hämolysekomponente beteiligt ist; die Gerbstoffwirkung in den zuckerhaltigen An-



sätzen ist sogar deutlich stärker. Bei höheren Tanigankonzentrationen dagegen kommt es zu deutlicher Kationendurchlässigkeitserhöhung.

2. **Hämatokritbestimmungen:** Zur weiteren Abgrenzung kolloid-osmotischer Mechanismen wurden Hämatokritbestimmungen durchgeführt. Die folgende Aufstellung gibt das Hämatokritvolumen  $V_H$  (Erythrocytenvolumen des Normalansatzes = 1) im Vergleich mit dem scheinbaren Schwellungsvolumen  $V'$  bei Versuchen mit synthetischen Gerbstoffen wieder:

Tabelle 1

Substanz	Konzentration mg $\%$	Versuchs- abschnitt	$V_H$	$V'$
Tanigan extra GR . . . . .	3	180—300 Min.	1,025	1,32
Tanigan extra GR . . . . .	5	240—360 Min.	1,015	1,40
Irgatan B . . . . .	5	240—360 Min.	1,025	1,33

Trotz der starken Resistenzverschiebung sind die Erythrocyten kaum geschwellt; daraus ist, in Übereinstimmung mit den Kompensationsversuchen zu folgern, daß eine nennenswerte Beteiligung eines kolloid-osmotischen Hämolysemechanismus bei den hier verwandten niedrigen Gerbstoffkonzentrationen nicht vorliegt.

Die bei verschiedenen Tanninkonzentrationen ermittelten Hämatokritwerte gibt die folgende Aufstellung wieder:

Tabelle 2

Tanninkonzentration mg $\%$	Versuchs- abschnitt	$V_H$	$V'$
10	180—300 Min.	1,065	1,18—1,32
10	60—240 Min.	1,055	1,17
20	180—300 Min.	1,09	1,37—1,42
20	300—420 Min.	1,06	1,38
50	240—360 Min.	1,15	1,47—1,57
50	120—300 Min.	1,12 —1,20	1,29—1,55

Auch bei den niedrigen Tanninkonzentrationen kommt es zu deutlicher Erhöhung des Hämatokritvolumens. In weiteren Versuchen (über die in anderem Zusammenhang berichtet wird) zeigte sich jedoch, daß auch bei Substanzen, die keine Verminderung der osmotischen Resistenz hervorrufen, ebenfalls ein erhöhtes Hämatokritvolumen festgestellt werden kann. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei d-Catechin gemacht: so war z. B. in einem Versuch mit 30 mg $\%$  d-Catechin, das keine deutliche Resistenzverminderung hervorrief, das Hämatokritvolumen 1,05, während bei dem Ansatz mit dem fermentativ oxydierten Produkt in gleicher Konzentration, das stark wirksam war ( $V'$  1,20—1,30), der Hämatokritwert auch nur 1,06 betrug.

Durch solche Beobachtungen erscheint die Bedeutung der Blutvolumenbestimmung zur Analyse der Natur von Resistenzverschiebungen eingeschränkt, oder nur brauchbar zum Ausschluß stärkerer Schwellungen. Die Aufstellung von Regressionsgeraden durch Auftragen der dem Fortschrei-

ten der Resistenzverschiebung entsprechenden Hämatokritwerte (Wilbrandt und Frei) war uns nicht in befriedigender Weise möglich.

3. Alkalibestimmungen: Weiteren Aufschluß über etwaige Kationenpermeabilitätsveränderungen ergaben Versuche, in denen der Alkaligehalt der Erythrocyten (Angaben in m Mol) unmittelbar bestimmt wurde.

Tabelle 3

Substanz	Versuchszeitpunkt											
	15 Min.				180 Min.				360 Min.			
	K	Na	K+Na	V'	K	Na	K+Na	V'	K	Na	K+Na	V'
Normalansatz . . .	91	7	98		90	8	98		91	10	101	
Tannin 10 mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub> . . .	89	11	100	1,12	82	20	102	1,13	80	26	106	1,16
Tannin 30 mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub> . . .	88	12	100	1,15	68	35	103	1,30	52	60	112	1,39
Normalansatz . . .	97	6	103		97	7	104		95	9	104	
Tanigan 5 mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub> . . .	96	6	103	1,38	94	10	104	1,40	91	10	101	1,40

Die künstlichen Gerbstoffe bewirken bei den verwendeten kleinen Konzentrationen nur einen geringen Kaliumverlust, der durch eine entgegengesetzte Natriumbewegung etwa ausgeglichen wird, so daß es zu keiner deutlichen Veränderung des osmotisch wirksamen Inhalts der Zellen kommt. Bei Tannin hingegen rufen bereits kleine Dosen, die nur eine mäßige Wirkung auf die osmotische Resistenz haben, deutlichen Kaliumverlust hervor; dem steht eine entgegengesetzte, meist stärkere Natriumbewegung gegenüber, woraus eine Vermehrung des osmotisch wirksamen Inhalts der Erythrocyten resultiert. Bei 30 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Tannin sind die entgegengesetzten Alkalibewegungen bereits sehr ausgeprägt. Diese Alkalibestimmungen bestätigen durch direkte Messung, was nach den Kompensationsversuchen und den Hämatokritbestimmungen zu erwarten war.

### III. Weitere Versuche:

1. Übertragungsversuche: In diesen wurde untersucht, in welchem Maße die Substanzen an die Blutkörperchen gebunden werden. Nach wechselnder Inkubationszeit wurden die Erythrocyten abzentrifugiert und die überstehende Lösung auf ihren Gehalt an wirksamer Substanz durch Zufügen neuer Blutsuspension geprüft. Ein Beispiel gibt der folgende Versuch mit Tannin:

Tabelle 4

Tanninkonzentration		2 mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	5 mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	10 mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	20 mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub>
scheinbares Schwellungsvolumen V'					
nach . . . . .	15 Min.	1,03	1,14	1,16	1,20
nach . . . . .	60 Min.	1,04	1,18	1,18	1,21
nach 60 Min. wurde abzentrifugiert und in der überstehenden Lösung neue Blutkörperchen suspendiert;					
ursprüngliche Tanninkonzentration		5 mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	10 mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	20 mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	
scheinbares Schwellungsvolumen V'					
nach . . . . .	15 Min.	1,00	1,05	1,18	
nach . . . . .	60 Min.	1,00	1,05	1,17	

Der Versuch zeigt, daß bei den kleinen Tanninkonzentrationen nach 60 Minuten Inkubation die Wirksamkeit stark abgenommen hat, während bei 20 mg% dies kaum der Fall ist. Der Wirkungsverlust ist durch Bindung an die Erythrocyten zu erklären.

2. A u s w a s c h v e r s u c h e : In diesen wurde die Frage der Reversibilität der Resistenzveränderungen geprüft. In dem folgenden Versuch wurde nach einer 15 Minuten währenden Inkubation ein Teil des Versuchsansatzes 2 mal gewaschen.

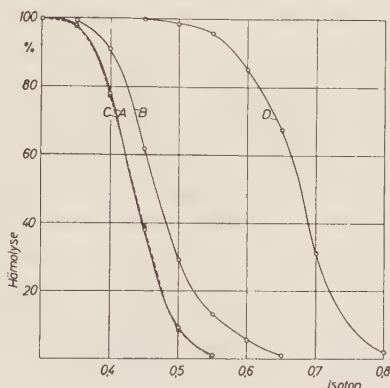
Tabelle 5

Tannin 10 mg%		V'	V'
scheinbares Schwellungsvolumen V' nach	15 Min.	1,13 → 2 mal gewaschen	
	60 Min.	1,14	1,21
	120 Min.	1,15	1,28
	180 Min.	1,15	1,33

Die Resistenzverminderung ist nicht reversibel; im Gegenteil, durch das Waschen kommt es zu weiterer Resistenzabnahme, die wohl durch kolloid-osmotische Hämolyse bedingt sein dürfte (zusätzliche Membranschädigung).

3. Weiteren Aufschluß erbrachten Versuche, in denen die Gerbstoffe den Phosphatpufferlösungen zur Ermittlung der Resistenzkurve zugesetzt wurden.

Abb. 7. Veränderung der osmotischen Resistenz von Pferdeerythrocyten durch den synthetischen Gerbstoff Irgatan B bei verschiedener Versuchsanordnung: A. Normale, unbeeinflusste Resistenzkurve; B. Zusatz der Blutsuspension zu den 5 mg% Irgatan B enthaltenden abgestuften Phosphatpufferverdünnungen; C. Zusatz von Irgatan B (endgültige Konzentration 5 mg%), nachdem die Blutsuspension bereits dazugegeben war; D. Zum Vergleich die Wirkung von 5 mg% Irgatan B, wenn dieses der Blutsuspension vor Ansatz der Resistenzreihe zugesetzt wird (wie in allen bisherigen Versuchen).



In der Anordnung B ist die Verminderung der osmotischen Resistenz nur mehr gering; in der Anordnung C kann eine solche überhaupt nicht mehr beobachtet werden. Die kurze Zeitspanne, welche die Erythrocyten zum Schwellen in den hypotonen Lösungen benötigen (weniger als 1 Minute), genügt offenbar um so viel Gerbstoff zu adsorbieren und damit die Membran so zu verändern, daß die Zellen noch deutlich früher hämolysieren. Ist dagegen die Schwellung (und die Hämolyse) bei Zusatz des Gerbstoffes bereits beendet, so ist eine Wirkung nicht mehr erkennbar, selbst nicht nach längerem Stehen in derartigen Lösungen. Dies erscheint um so bemerkenswerter, als unter diesen Versuchsbedingungen die Gerbstoffmenge pro Erythrocyt um das Zehnfache erhöht ist.



**Gerbstoffhaltige Drogen:** In Ergänzung dieser Versuche wurden einige gerbstoffhaltige Drogen untersucht.

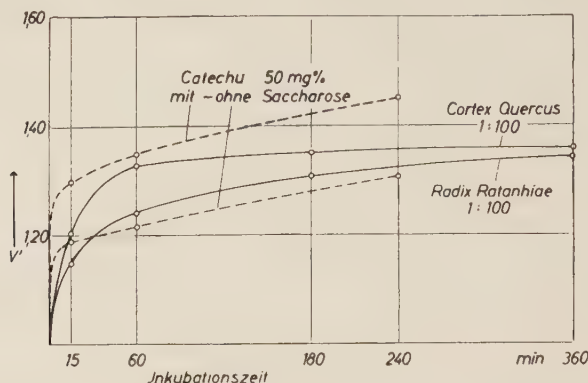


Abb. 8. Scheinbares Schwellungsvolumen von Pferdeerythrocyten unter der Einwirkung verschiedener gerbstoffhaltiger Drogenauszüge.

Auch unter der Einwirkung gerbstoffhaltiger Drogenauszüge kommt es zu einer Verminderung der osmotischen Resistenz; der bei Catechu durchgeführte Kompensationstest läßt darauf schließen, daß auch hierbei der Wirkung eine Verminderung des kritischen Hämolysevolumens der Zellen zugrunde liegt.

### Besprechung der Ergebnisse

Wie die Befunde zeigen, wird die Membran von Pferdeerythrocyten unter der Einwirkung von Gerbstoffen dergestalt verändert, daß sie bei Schwellung in hypotonen Lösungen früher als normal für Hämoglobin durchlässig wird; das kritische Hämolysevolumen ist also vermindert. Diese Wirkung auf die Erythrocytenmembran tritt nur dann in Erscheinung, wenn diese einer Verformung (durch Schwellen der Zellen) unterworfen wird (Ausbleiben der Wirkung bei nachträglichem Gerbstoffzusatz). Dies spricht dafür, daß die Verminderung des kritischen Hämolysevolumens nicht durch Schrumpfung, sondern durch herabgesetzte Elastizität oder erhöhte Starre der Zellmembran bedingt ist. Das steht in Parallele zu der verringerten Dehnbarkeit adstringierten Bindegewebes.

Schrumpfung und verminderte Dehnbarkeit oder Verformbarkeit sind Vorgänge, die zunächst eng verwandt erscheinen. Untersuchungen von Wilbrandt, Ryser und Witt an der Rattenschwanzsehne haben jedoch gezeigt, daß beide Wirkungen durchaus getrennt werden können, daß diesen sogar entgegengesetzte Vorgänge an den Strukturproteinen zugrunde liegen und nur die verminderte Dehnbarkeit, nicht aber die Schrumpfung, als charakteristisch für die Adstriktion gelten kann. Nach Küntzel liegt der Gerbung als wesentlicher Grundvorgang eine Versteifung der Hautfasern durch Gitterverfestigung zugrunde.

Der Wirkung der Gerbstoffe liegt deren Bindung an die Membran zugrunde. Bei dem schnellen Wirkungseintritt und der beträchtlichen Mole-

külgröße der gerbenden Substanzen kann angenommen werden, daß diese nur an der Oberfläche der Membran fixiert zu werden brauchen und nicht erst in die Membran oder durch diese dringen müssen um wirksam zu werden. Nach den Untersuchungen von *Schulman* dringt Tannin nicht in monomolekulare Filme aus biologischen Membranbestandteilen ein, es kommt nur zu lockeren Adsorptionsbindungen (Dipolbindungen). Es ist damit aber nicht ausgeschlossen, daß bei längerer Einwirkung und höheren Gerbstoffkonzentrationen auch ein Eindringen in die Membran stattfindet; dies stünde in Parallele zu der Feststellung, daß bei der technischen Gerbung das Eiweißgel mit den Gerbstoffen „permutoid durchreagiert“ (*Stather*), die Gerbstoffe also nicht nur auf der Oberfläche der Proteinmizellen gebunden werden.

Zufolge der allgemein anerkannten Vorstellung von einer Bindung der Gerbstoffe an Eiweißstrukturen, kann auch für die Erythrocyten angenommen werden, daß die Fixierung der Gerbstoffe durch Faserproteine der Zellmembran erfolgt. Dies erscheint bemerkenswert in Hinsicht auf Befunde von *Wilbrandt* und *Frei* über die Auslösung recht ähnlicher Resistenzveränderungen an Erythrocyten durch Digitonin bei niedriger Temperatur. *Wilbrandt* sieht hierbei, gestützt auf alte Auffassungen und auf die neueren Befunde *Schmidt-Thomés* über Digitonin-Cholesteride, im Cholesterin der Zellmembran den Reaktionspartner des Digitonins. Wie die durch Detergentien ausgelöste „Grenzvolumhämolys“ (*Wilbrandt* 1953) einzuordnen ist, müssen weitere Versuche zeigen.

Die Dosenwirkungskurven der verschiedenen Substanzen im allerersten Versuchsstadium zeigen, daß die Resistenzverminderung, von einer gewissen Konzentration ab durch weitere Erhöhung nur mehr wenig gesteigert werden kann; dies ist besonders bei fermentativ oxydiertem d-Catechin ausgeprägt (Abb. 3). Es ist anzunehmen, daß dies mit einer weitgehenden Sättigung der Oberflächenbesetzung der Membran (oder bestimmter Abschnitte derselben) zusammenhängt. Die Übertragungsversuche haben gezeigt (Tabelle 4), daß z. B. 10 mg<sup>0</sup>/<sub>100</sub> Tannin nach einstündiger Inkubation zum großen Teil aus der Lösung entfernt und wohl an die Erythrocyten gebunden wird. Für das in diesen Ansätzen vorhandene Tannin trifft je Molekül, unter Zugrundelegung eines Mol.Gew. von etwa 1600 (*Bohlmann*) eine Erythrocytenoberfläche von etwa 200 Å<sup>2</sup>. Dies liegt größenordnungsmäßig im Bereich der Dimension des Tanninmoleküls.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß bei den künstlichen Gerbstoffen und bei den aus d-Catechin entstandenen gerberisch wirksamen Substanzen eine hochgradige Verminderung des kritischen Hämolysvolumens vorliegen kann, ohne daß, selbst nach mehrstündigem Versuch, es zu stärkerer Kationenpermeabilitätssteigerung kommen muß. Bei Tannin hingegen tritt sie bereits nach verhältnismäßig geringen Graden der Gerbung in Erscheinung. Daraus kann gefolgert werden, daß die Gerbwirkung auf Zellmembranen nicht zwangsläufig mit einer Kationenpermeabilitätssteigerung verknüpft ist. *Wilbrandt* (1942) hat erstmals darauf hingewiesen, daß Eiweißdenaturantien eine kolloid-osmotische Hämolys hervorrufen. Es scheinen sich damit zwei entgegengesetzte Wirkungen an den Eiweiß-

mizellen der Erythrocytenmembran abzuzeichnen: eine vernetzende durch Gerbstoffe mit Verminderung des kritischen Hämolysevolumens, und eine auflöckernde durch Denaturantien mit kolloid-osmotischer Hämolyse im Gefolge. Inwieweit sich diese beiden Grundwirkungen am gleichen Erythrocyten abgrenzen lassen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

### Zusammenfassung

1. Unter der Einwirkung von Gerbstoffen (Tannin, Catechingerbstoff, synthetischen Gerbstoffen, gerbstoffhaltigen Drogenauszügen) erfährt die osmotische Resistenz von Pferdeerythrocyten eine Erniedrigung. Diese Resistenzverminderung setzt sehr schnell ein und gelangt alsbald mehr oder weniger vollständig zum Stillstand.
2. Der Kompensationstest mit Saccharose, Hämatokrit- und Alkalibestimmungen zeigen, daß diese Resistenzverschiebung auf einer Verminderung des kritischen Hämolysevolumens der Zellen beruht; bei höheren Konzentrationen einzelner Gerbstoffe kommt es bei längerer Einwirkung auch zu Kationenpermeabilitätserhöhung und damit zu kolloid-osmotischer Hämolyse.
3. Der Verminderung des kritischen Hämolysevolumens der Zellen liegt eine Bindung der Gerbstoffe an die Erythrocytenmembran zugrunde; die Membranveränderung ist irreversibel. Unterbleibt nach der Einwirkung der Gerbstoffe eine Schwellung der Zellen, so ist die Gerbung der Zellmembran nicht erkennbar.
4. Aus diesen Befunden wird geschlossen, daß durch die Bindung der Gerbstoffe an Eiweißstrukturen der Erythrocytenmembran diese in ihrer Elastizität oder Verformbarkeit beeinträchtigt wird. Eine solche Starre der Zellmembran steht in Parallele zu der verringerten Dehnbarkeit adstringierten Bindegewebes.

### Summary

The addition of various tanning agents to horse red cells results in a decrease of the osmotic resistance which starts rapidly and subsides soon. The basis of this reaction is the decrease of the critical volume of hemolysis which has been correlated to the capacity of the protein-structures of the red cells to bind tanning agents.

### Résumé

Par l'action de substances tannantes sur les érythrocytes du cheval la résistance osmotique subit une diminution qui commence très rapide, mais qui s'arrête bientôt. Fondamental il s'agit d'une diminution du volume critique d'hémolyse des globules sanguins qui aurait un rapport avec une combinaison des substances tannantes avec les structures protéiniques de la membrane cellulaire.

### Schrifttum

- Bohlmann, A., Arch. exper. Path. Pharmak. **203** (1944): 317 — Heubner, W. u. E. Schreiber, Arch. exper. Path. Pharmak. **184** (1937): 340 — Jacobs, M. H., Stewart and Butler, Zit. n. W. Wilbrandt (1951—52) — Keilin, D. and T. Mann, Proc. Roy. Soc. London. - Biol. Sc. **122**: 119, zit. n. K. Zeile in E. Bamann und K. Myrbäck: Die Methoden der Fermentforschung, Bd. 3, Leipzig 1941 — Küntzel, A. und A. Riß, Coll. **1936**: 663; zit. n. Stather — Muralt, A. v., Praktische Physiologie, Berlin-Heidelberg 1948 — Ponder, E., Hemolysis and Related Phenomena; New York 1948 — Schmidt-Thomé, J., Zschr. physiol. Chem. **275** (1942): 183 — Schulman, J. H., Trans. Farad. Soc. **33** (1937): 1116 — Stather, F., Gerbereichemie und Gerbereitechnologie, 2. Aufl. Bln. 1951 — Staudinger, H., Organische Kolloidchemie, Braunschweig 1940 — Wilbrandt, W., Pflügers Arch. **245**



(1942): 22 — *ders.*, Helvet. physiol. pharmacol. acta **6** (1948): 234 — *ders.*, Arch. exper. Path. Pharmac. **212** (1951-52): 9 — *ders.*, Helvet. physiol. pharmacol. acta **11** (1953): C 32 — Wilbrandt, W. u. S. Frei, Arch. exper. Path. Pharmac. **225** (1955): 463 — Wilbrandt, W. u. H. Heimann, Helvet. physiol. pharmacol. Acta **6** (1948): 750 — Wilbrandt, W., H. Ryser u. P. N. Witt, Arch. exper. Path. Pharmac. **215** (1952): 469 — Wilbrandt, W. u. H. U. Wyss, Helvet. physiol. pharmacol. Acta **5** (1947): 457

*Aus dem Physiologischen Institut der Friedrich Schiller-Universität Jena  
(Direktor: Prof. Dr. Friedrich Schwarz)*

## **Über eine neue Methode der heterochromen Photometrie**

*Von Friedrich Schwarz*

Mit 3 Abbildungen

Eingegangen am 17. September 1956

In früheren Untersuchungen (Schwarz und Wintzer 1954, Schwarz, Wintzer und Langer 1955) bin ich mit meinen Mitarbeitern der Frage nachgegangen, mit welcher Genauigkeit eine Versuchsperson nach einer gegebenen, festen Lichtblitzfrequenz eine zweite Reihe intermittierender Lichtreize variabler Frequenz auf gleiche Frequenz mit der festen einstellen kann, wenn beide Frequenzen abwechselnd nacheinander dargeboten werden. Auch Mowbray und Gebhard (1955) haben hierüber Versuche angestellt.

Bartley (1938) hat gefunden, daß in der Nähe der Verschmelzungsfrequenz ein Flimmerlicht von einer bestimmten physikalischen Frequenz mit einer um so niedrigeren subjektiven Frequenz zu flimmern scheint, je heller es ist, und mit einer um so höheren subjektiven Frequenz, je geringer seine Helligkeit ist. Von diesem Befund ausgehend haben wir ein neues Verfahren der heterochromen Photometrie erprobt, indem eine farbige „Fragefrequenz“ von variabler Helligkeit mit einer gegenfarbigen „Festfrequenz“ von konstanter Helligkeit auf Frequenzgleichheit eingestellt wurde. Mit diesem neuen Verfahren habe ich nun weitere Versuche angestellt, über die in der vorliegenden Mitteilung berichtet werden soll.

Die subjektiven Helligkeitswerte des energiegleichen Spektrums bestimmt man bekanntlich mit Hilfe der Flimmerphotometrie (vgl. Dresler 1941) oder durch die Messung der Eindruckshelligkeit (Kohlrausch 1923, v. Kries 1923). Ich habe nun die Helligkeitswerte mit Hilfe der Einstellung auf Frequenzgleichheit ermittelt und mit den Ergebnissen der beiden anderen Verfahren verglichen. Hierüber soll ebenfalls berichtet werden.

### *Methodik*

Methodik und Versuchsverlauf sind in meinen früheren Mitteilungen (1954, 1955) beschrieben worden. Die Versuchspersonen waren helladaptiert und beobachteten binokular. Die weiße „Fragefrequenz“ wurde einmal „von oben kommend“, einmal „von unten kommend“ auf Frequenzgleichheit mit der far-

bigen Festfrequenz von 10 Lichtblitzen pro Sekunde (L/s) eingestellt. Die Leuchtdichte der weißen „Fragefrequenz“ konnte mit Hilfe von Neutralfiltern in 16 Stufen in dem Bereich von 0,1125 bis 900,0 asb variiert werden (vgl. Tabelle 1).

Um die farbigen Lichter energiegleich zu machen, wurde die von den Farbfiltern durchgelassene Lichtenergie mit Thermosäule und Galvanometer gemessen. Die Infrarotstrahlung wurde von der Thermosäule durch Einhalten eines großen Abstandes zwischen Projektor und Thermosäule und durch Vorschalten von Infrarotfiltern weitestgehend ferngehalten. Alle Farbfilter wurden durch Vorsetzen von Neutralfiltern energiegleich gemacht, d. h. auf gleichen Galvanometerausschlag einreguliert. Die Farbfilter ließen Licht aus einem mehr oder weniger großen Bereich des Spektrums durch, es konnte aber eine „Hauptdurchlässigkeit“ ermittelt werden, die auch ihre Farbe bestimmte. In der folgenden Übersicht sind die Durchlässigkeitszahlen wiedergegeben worden:

Farbe	Durchlässigkeit	Hauptdurchlässigkeit
rot . . . . .	720—650 m $\mu$	690 m $\mu$
orange . . . . .	700—565 m $\mu$	620 m $\mu$
gelb . . . . .	700—530 m $\mu$	590 m $\mu$
gelbgrün . . . . .	610—505 m $\mu$	545 m $\mu$
grün . . . . .	570—490 m $\mu$	540 m $\mu$
blaugrün . . . . .	545—450 m $\mu$	500 m $\mu$
blau . . . . .	500—420 m $\mu$	460 m $\mu$

Die Versuche wurden mit zwei geübten Versuchspersonen, die normal farben-tüchtig waren, von Juli bis September 1955 durchgeführt.

### Versuche und Ergebnisse

Die weiße Fragefrequenz von variabler Helligkeit wurde mit einer far-bigen Festfrequenz von 10 L/s und konstanter Helligkeit auf Frequenz-gleichheit eingestellt. Es ergab sich eine Versuchsreihe, wie sie in Ta-belle 1 wiedergegeben worden ist: Hat die weiße Fragefrequenz eine ge-ringe Leuchtdichte (Filternummern 1 bis 3), dann scheint sie „schnell“ zu flimmern und es muß eine physikalisch niedrige Frequenz eingestellt wer-den, damit sie subjektiv ebensoschnell wie die grüne Festfrequenz flim-mert; ist die Fragefrequenz sehr hell (Filternummern 5 bis 16), dann ist es umgekehrt. Bei Filternummer 4 wurde auf physikalische Frequenz-gleichheit eingestellt und daraus wurde geschlossen, daß Fest- und Frage-frequenz subjektiv gleich hell sind. Zum Vergleich wurde die Helligkeit des grünen Lichtes nach der bisher üblichen flimmerphotometrischen Me-thode bestimmt. Aus der Spalte 6 der Tabelle 1 geht hervor, daß das Mini-mum der Verschmelzungsfrequenz bei Filternummer 4 liegt. Es stimmen also die subjektiven Helligkeitswerte, die mit den beiden Methoden er-mittelt wurden, überein.

In Abb. 1 sind in der oberen durchgezogenen Kurve (schwarze Punkte, Ordinaten L/s auf der rechten Seite angegeben) die Fragefrequenzen, die beim Vergleich mit einer gelben Festfrequenz von 10 L/s eingestellt wor-den sind, wiedergegeben. Man sieht, daß die Kurve bei 11 asb die 10 L/s-Ordinate schneidet, d. h., daß die Fragefrequenz auf 10 L/s eingestellt wird, wenn sie die Leuchtdichte von 11 asb hat.



Tabelle 1

Versuchsperson S, grün. Helligkeitsstufe 3.

Neutral- filter Nr.	Leuchtdichte des Neutral- filters asb	Frage- frequenz Hz	$\Delta f$ Hz	$\Delta f^2$	Verschmelzungs- frequenz Hz
1	0,1125	7,4	2,6	6,76	20,0
2	0,450	8,9	1,1	1,21	18,5
3	0,657	9,4	0,6	0,36	15,6
4	0,900	10,0	0	0	13,4
5	1,80	11,0	1,0	1,0	19,5
6	4,50	12,9	2,9	8,41	26,6
7	7,56	14,2	4,2	17,64	30,0
8	13,5	15,2	5,2	27,04	33,2
9	26,1	16,3	6,3	39,69	35,1
10	45,9	18,3	8,3	68,89	38,1
11	73,8	19,7	9,7	94,09	39,5
12	94,5	20,2	10,2	104,04	42,0
13	225,0	23,5	13,5	182,25	44,7
14	450,0	23,8	13,8	190,44	45,4
15	657,0	23,8	13,8	190,44	47,1
16	900,0	25,5	15,5	240,25	48,8

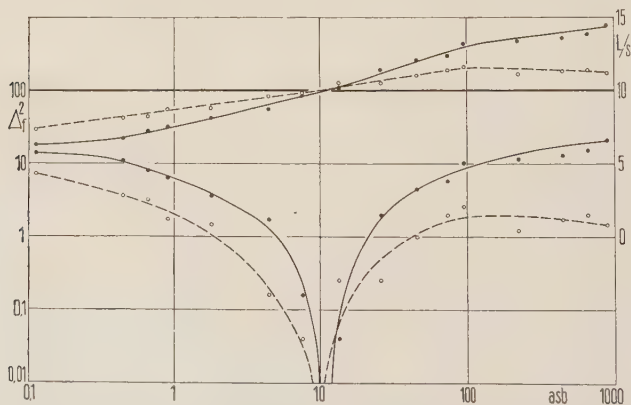


Abb. 1. Einstellung zweier Flimmerlichter auf Frequenzgleichheit. Versuchsperson S, gelb. Schwarze Punkte und durchgezogene Kurven: Einstellung nach dem bildmäßigen Eindruck. Weiße Punkte und gestrichelte Kurven: Versuchsperson hat versucht, mitzuzählen. Oberes Kurvenpaar und rechte Ordinatenachse: Lichtblitze pro Sekunde (L/s). Untere Kurven und linke Ordinatenachse: Quadrat der Abweichung der Fragefrequenz von der Festfrequenz ( $\Delta f^2$ ). Abszissenachse: Leuchtdichte in Apostilb.

Es hat sich nun gezeigt, daß es zwei „Methoden“ gibt, um Fest- und Fragefrequenz auf subjektive Frequenzgleichheit einzustellen: Die Versuchsperson kann sich einmal nach dem bildmäßigen Eindruck des Flimmerns richten; dann werden Frequenzen eingestellt, die in Abb. 1 in der soeben besprochenen durchgezogenen Kurve wiedergegeben worden sind. Die Versuchsperson kann aber auch versuchen, die Lichtstöße des Flim-

merns mitzuzählen; dann werden Fragefrequenzen eingestellt, die der Festfrequenz von 10 L/s wesentlich näher liegen und die in Abb. 1 zu der oberen gestrichelten Kurve (weiße Punkte) zusammengefaßt worden sind. Die erstere Methode führt wegen der größeren Steilheit der Kurven zu besseren Ergebnissen.

Der Schnittpunkt der Fragefrequenz-Kurve mit der 10 L/s-Ordinate ist oft nicht genau zu ermitteln. Ich habe deshalb die Abweichung  $\Delta_f$  der Fragefrequenz von 10 L/s quadriert (Spalten 4 und 5 der Tabelle 1) und in den weiteren Versuchen die subjektive Helligkeit des farbigen Lichtes graphisch ermittelt. In Abb. 1 ist dies in den unteren Kurven für den Versuch mit gelbem Licht dargestellt worden (die Ordinaten  $\Delta_f^2$  sind auf der linken Seite angegeben). Die Nullstellen (= Durchgänge der oberen Kurven durch die 10 L/s-Ordinate) lassen sich recht gut ermitteln.

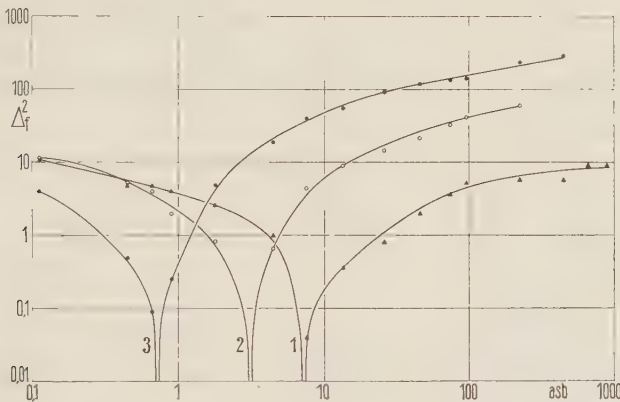


Abb. 2. Einstellung auf Frequenzgleichheit bei drei verschiedenen Helligkeitsstufen. Versuchsperson S, rot. Abszissen: Leuchtdichte in Apostilb. Ordinaten: Quadrat der Abweichung der Fragefrequenz von der Festfrequenz.

Es wurden nun die Farben Rot, Grün, Gelb und Blau in drei Helligkeitsstufen flimmerphotometrisch annähernd gleich hell gemacht. Dann wurde die subjektive Helligkeit dieser farbigen Lichter mit Hilfe der Einstellung auf Frequenzgleichheit ermittelt und schließlich wurde die „Eindruckshelligkeit“ bestimmt, wobei weißes und farbiges Licht in einander berührenden halbkreisförmigen Feldern dargeboten und die Helligkeit des weißen Lichtes solange verändert wurde, bis beide Lichter gleich hell erschienen. Abb. 2 zeigt die Ergebnisse der Versuchsperson S bei Einstellung auf Frequenzgleichheit mit rotem Licht in drei Helligkeitsstufen. In Stufe 1 wird Helligkeitgleichheit mit weißem Licht von 7,3 asb, in Stufe 2 von 3,10 asb, in Stufe 3 von 0,71 asb erhalten. Flimmerphotometrisch ergaben sich die Helligkeitswerte 40,8 asb (1), 4,27 asb (2) und 0,89 asb (3). Die beiden Methoden führen also bei kleineren Leuchtdichten zu gut übereinstimmenden Resultaten, bei größerer Leuchtdichte nicht. Die Befunde bei einer anderen Versuchsperson (K) sind in Tabelle 2 wiedergegeben worden. Man sieht, daß zwischen den Ergebnissen der Flimmerphotometrie und der Einstellung auf Frequenzgleichheit in den Stufen 2 und 3 eine

gute Übereinstimmung herrscht, daß dagegen in Stufe 1 mit der Einstellung auf Frequenzgleichheit das farbige Licht weniger hell als bei Anwendung der Flimmerphotometrie erscheint. Bei der Einstellung auf Eindruckshelligkeit erscheinen die Farben heller als mit den anderen beiden Methoden; dies gilt für alle vier Farben.

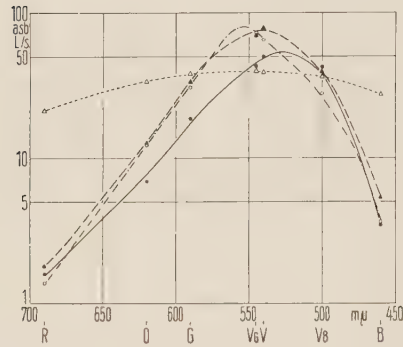


Abb. 3. Ermittlung der spektralen Hellempfindlichkeit nach vier Methoden. Versuchspersonen K und S. Durchgezogene Kurve und schwarze Punkte: Einstellung auf Frequenzgleichheit, strichpunktiierte Kurve und weiße Punkte: Flimmerphotometrie, langgestrichelte Kurve und schwarze Dreiecke: Einstellung nach Eindruckshelligkeit, kurzgestrichelte Kurve und weiße Dreiecke: Flimmer-Verschmelzungsfrequenz. Abszissen: Spektrum. Ordinaten: für die 3 zuerst genannten Kurven Leuchtdichte in Apostilb, für die 4. Kurve Lichtblitze pro sekunde

Tabelle 2

Versuchsperson K.

Farbe	Verfahren ↓	Stufe →	1	2	3
			Helligkeit (Leuchtdichte in asb)		
Rot	Flimmerphotometrie . . . . .		45,9	4,50	0,80
	Einstellung auf Frequenzgleichheit . . . . .		28,8	3,67	0,84
	Einstellung auf Eindruckshelligkeit . . . . .		94,4	7,55	1,58
Grün	Flimmerphotometrie . . . . .		45,9	4,50	0,94
	Einstellung auf Frequenzgleichheit . . . . .		23,0	3,84	0,90
	Einstellung auf Eindruckshelligkeit . . . . .		94,4	7,20	0,90

In einer anderen Versuchsreihe wurden die subjektiven Helligkeitswerte von sieben energiegleichen Farben bestimmt. Es kamen dabei vier Methoden zur Anwendung: 1. die Flimmerphotometrie, 2. die Einstellung auf Frequenzgleichheit, 3. die Ermittlung der Eindruckshelligkeit und 4. die Einstellung der Flimmer-Verschmelzungsfrequenz. Die Befunde sind in Abb. 3 dargestellt, es sind die Ergebnisse bei den Versuchspersonen K und S zusammengefaßt worden. Das Helligkeitsmaximum liegt je nach der angewandten Methode an anderer Stelle: Mit der Flimmerphotometrie findet man es bei 554 mμ, mit der Einstellung auf Frequenzgleichheit bei 528 mμ, die Eindruckshelligkeit hat bei 540 mμ ihr Maximum und die Einstellung der Flimmer-Verschmelzungsfrequenz gibt bei etwa 545 mμ ein recht flaches Maximum. Die flimmerphotometrisch gefundenen Werte stim-



men mit den als Normalwerte von der Internationalen Beleuchtungskommission festgelegten Meßpunkten (IBK-Kurve, Maximum bei  $555\text{ m}\mu$ ) gut überein (vgl. *Dresler* 1941 und *Schwarz, Krause und Volkmer* 1956 \*). Die IBK-Kurve ist aus flimmerphotometrischen Untersuchungen, Messungen der Eindruckshelligkeit und dem Kleinstufenverfahren, wobei Lichter von benachbarter Wellenlänge miteinander verglichen werden, hervorgegangen.

### Diskussion

Die Maxima in Abb. 3 liegen bei verschiedenen Wellenlängen, das Maximum der Helligkeitskurve, die nach der Methode der Einstellung auf Frequenzgleichheit erhalten wurde, liegt am weitesten im kurzwelligen Bereich und weicht am stärksten von der IBK-Kurve ab.

*Preston* (1939) und *Dresler* (1940, 1941) haben gefunden, daß die spektrale Hellempfindlichkeit eine jahreszeitliche Abhängigkeit aufweist. Das Maximum liegt im Sommer bei einer kürzeren Wellenlänge als im Winter. Nun wurden aber unsere Messungen nach allen vier Methoden gleichzeitig und in einem relativ kurzen Zeitraum (Juli bis September) durchgeführt. Jahreszeitlich bedingte Verschiebungen der Kurvenmaxima sind also unwahrscheinlich.

Es ist bekannt, daß die spektrale Hellempfindlichkeit durch Reize, die auf andere Sinnesorgane einwirken, beeinflußt werden kann. *Krawkow* (1939, 1955) hat gefunden, daß akustische Reize, ferner Geschmacks-, Geruchs- und thermische Reize die spektrale Hellempfindlichkeit beeinflussen können. Bei unseren Messungen kam bei drei Methoden als akustischer Reiz das Motorengeräusch hinzu, das nur bei der Einstellung auf Eindruckshelligkeit fehlte. Das Motorengeräusch war in gleicher Weise bei der Flimmerphotometrie wie bei der Einstellung zweier Flimmerlichter auf Frequenzgleichheit vorhanden, es kann also nicht die Ursache für die verschiedene Lage der Maxima sein. Aus den Befunden von *Krawkow* scheint mir aber hervorzugehen, daß man bei der Messung der spektralen Hellempfindlichkeit nicht die Netzhaut als isoliertes Organ untersucht, sondern daß Funktionszustände des Zentralnervensystems bei diesen Messungen eine große Rolle spielen. Dies gilt in besonders hohem Maße für die Einstellung zweier Flimmerlichter auf Frequenzgleichheit: es werden hierfür offenbar höchste Gebiete des Zentralnervensystems in Anspruch genommen; das Auge hat hauptsächlich nur eine Vermittlerfunktion (vgl. *Schwarz und Wintzer* 1954). Bei der Bestimmung der Flimmer-Verschmelzungsfrequenz kann man im Zweifel sein, welche Erscheinungen der Fusion auf der Trägheit der Sehelemente und der chemischen Prozesse in ihnen, welche auf der Tätigkeit nervöser Zentren beruhen. Das gleiche gilt für die Flimmerphotometrie und für die Bestimmung der Eindruckshelligkeit. Für diese beiden letzteren Methoden wird man vielleicht der Funktion der Netzhaut den Vorrang lassen.

Für die Messung der spektralen Hellempfindlichkeit ist die rein foveale Beobachtung sehr wichtig (vgl. *Dresler* 1941, *Rosenberg* 1928). Bei meinen Untersuchungen nahm das kreisförmige Prüffeld einen Gesichtswinkel von  $1^{\circ} 10'$  ein;

\* Diese Zeitschrift 108, S. 363, Abb. 1.

das Prüffeld wird also beim Fixieren nur auf der fovea centralis abgebildet. Das Umfeld hatte eine Leuchtdichte von 12 asb und nahm einen Gesichtswinkel von  $16^{\circ} 40'$  ein. Die Bedingungen waren also so, daß nur bei Helladaptation und nur die Funktion des Zapfenapparates untersucht wurde.

Die Untersuchungen konnten nur an zwei Versuchspersonen durchgeführt werden, weil uns eine größere Zahl geübter Versuchspersonen nicht zur Verfügung stand. Die Ergebnisse der Einstellung auf Frequenzgleichheit, die wir von zwei weiteren ungeübten Versuchspersonen erhalten hatten, konnten nicht verwertet werden, weil diese Versuchspersonen „mitzählten“ und ihre Meßergebnisse nicht eindeutig ermittelt werden konnten (vgl. Abb. 1).

Aus Abb. 3 geht ferner hervor, daß die Maxima der einzelnen Kurven bei verschiedenen Leuchtdichten liegen. Während die Helligkeitsmaxima bei der Flimmerphotometrie und bei der Bestimmung der Eindruckshelligkeit sich nur wenig voneinander unterscheiden und bei etwa 78 asb liegen, liegt das Maximum bei der Einstellung auf Frequenzgleichheit wesentlich niedriger, nämlich bei etwa 54 asb. Aus Tabelle 2 geht hervor, daß in Helligkeitsstufe 1, angedeutet auch in Stufe 2, bei der Einstellung auf Frequenzgleichheit das farbige Licht weniger hell als bei Anwendung der Flimmerphotometrie erscheint. Diese Befunde legen den Gedanken nahe, daß bei der Einstellung auf Frequenzgleichheit das Additivitätsgesetz nicht gilt. *Dresler* (1941) hat die Auffassung vertreten, daß das Additivitätsgesetz, das für die Gültigkeit der heterochromen Photometrie unerlässlich ist, nur für die Flimmerphotometrie gilt. Dieser Befund könnte also die Brauchbarkeit des neuen Verfahrens für die heterochrome Photometrie erheblich einschränken.

Die heterochrome Photometrie ist nach wie vor ein recht problematisches Gebiet und alle bisher angewandten Methoden des heterochromen Vergleichs zeigen, daß das Farbsehen in hohem Maße von zentralnervösen Vorgängen abhängig ist. Zentralnervöse Vorgänge sind durch Pharmaka, durch Sinnesreize (Ablenkung der Aufmerksamkeit) durch Ermüdung usw. beeinflussbar. Es sind in letzter Zeit zahlreiche Arbeiten über die Abhängigkeit der Flimmer-Verschmelzungsfrequenz von solchen Faktoren erschienen (*Roback, Krasno und Ivy* 1952, *Brožek, Simonson und Taylor* 1953, *Arnold* 1953, *Arnold und Wachholder* 1953, *Grandjean, Egli, Diday, Bloch und Gfeller* 1953, *Landis und Hamwi* 1954, *Landis* 1954, *Flemming* 1954). Es bleibt abzuwarten, ob und wie weit die Einstellung von Flimmerlichtern auf Frequenzgleichheit von den gleichen Faktoren beeinflusst wird.

### Zusammenfassung

Der Befund, daß die subjektive Flimmerfrequenz einer Lichtblitzserie um so niedriger zu sein scheint, je heller das Flimmerlicht ist, läßt sich zur heterochromen Photometrie benutzen: eine farbige „Festfrequenz“ von 10 Lichtblitzen pro Sekunde und von konstanter Helligkeit und eine weiße „Fragefrequenz“ von variabler Frequenz und Leuchtdichte werden nur dann auf physikalisch gleiche Frequenz eingestellt, wenn beide gleich hell erscheinen. Mit Hilfe dieser Methode wird die spektrale Hellempfindlichkeit der fovea centralis untersucht. Die Ergebnisse werden mit anderen gebräuchlichen Methoden der heterochromen Photometrie, die etwas abweichende Resultate liefern, verglichen. Für die neue Methode scheint das Additivitätsgesetz nicht zu gelten, was ihre Brauch-

barkeit einschränkt. Da aber mit der Methode des Frequenzvergleichs zweier Flimmerlichter Funktionen des Zentralnervensystems untersucht werden, ist sie vielleicht für pharmakologische und arbeitsphysiologische Untersuchungen anwendbar.

### Summary

Two series of light-flashes can be adjusted to the same physical frequency only if both appear to the same degree bright. By means of this method the sensitivity of the fovea centralis to the spectral light intensity has been investigated.

### Résumé

Deux séries de lampes-éclair électriques sont mises à la même fréquence physique seulement quand elles apparaissent avoir la même clarté. Avec cette méthode on examine la sensibilité spectrale à la lumière de la fovea centralis.

### Schrifttum

Arnold, H., Arb. Physiol. **15** (1953): 62 — Arnold, H. u. K. Wachholder, Arb. Physiol. **15** (1953): 139 — Bartley, S. H., J. Exper. Psychol. **22** (1938): 388 — Brožek, J., E. Simonson a. H. L. Taylor, J. Appl. Physiol. **5** (1953): 330 — Dresler, A., Licht **10** (1940): 79 — ders., Naturwiss. **29** (1941): 225 — Flemming, K., Klin. Wschr. **1954**: 325 — Grandjean, E., R. Egly, F. Diday, W. Bloch u. H. Gfeller, Helvet. physiol. acta **11** (1953): 355 — Krawkow, S. W., Acta med. URSS **2** (1939): 461 — ders., Das Farbensehen. Berlin 1955 — Kohlrausch, A., Pflügers Arch. **200** (1923): 210 — Kries, J. v., Naturwiss. **11** (1923): 461 — Landis, C., Physiol. Rev. **34** (1954): 259 — Landis, C. and V. Hamwi, J. Appl. Physiol. **6** (1954): 566 — Mowbray, G. H. and J. W. Gebhard, Science (Lancaster, Pa.) **121** (1955): 173 — Preston, J. S., Proc. Physiol. Soc., Lond. **51** (1939): 757 — Roback, G. S., L. R. Krasno and A. C. Ivy, J. Appl. Physiol. **4** (1952): 566 — Rosenberg, G., Zschr. Sinnesphysiol. **59** (1928): 103 — Schwarz, F. u. H. Wintzer, Pflügers Arch. **260** (1954): 74 — Schwarz, F., H. Wintzer u. H. Langer, Pflügers Arch. **261** (1955): 295 — Schwarz, F., M. Krause u. E. Volkmer, Zschr. Biol. **108** (1956): 361



*Aus dem Zoologischen Institut der Universität Köln  
(Direktor: Professor Dr. O. Kuhn)*

## Untersuchungen über die Farbempfindlichkeit des Höhlenfisches *Anoptichthys jordani* Hubbs und Innes (Characidae)

Von Georges Thines \* und Joachim Kähling \*\*

Mit 3 Abbildungen

Eingegangen am 28. September 1956

### *A. Einleitung und Problemstellung.*

Nach der Erstbeschreibung des in einigen Höhlengewässern Zentralmexikos lebenden Fisches *Anoptichthys jordani* (Hubbs und Innes 1936) wurde insbesondere die eigenartige Rückbildung seiner Augen von verschiedenen Gesichtspunkten aus untersucht (Gresser u. Breder 1940, Lüling 1953, 1955, Kuhn und Kähling 1954). Diese erreicht bei den nach Europa eingeführten und hier weitergezüchteten Tieren ein Stadium, bei dem kaum noch eine Rezeption von Lichtreizen erwartet werden kann. Mit Hilfe von spontanen Wahlversuchen stellten Breder (1944), Breder und Rasquin (1947), Lüling (1954) und Thines (1954) fest, daß die Fische jedoch sehr wohl lichtempfindlich sind und in den meisten Fällen ein — wenn auch oft schwaches — photophobisches Verhalten zeigen. Unter Anwendung der Dressurmethode konnten Kuhn und Kähling (1954) genauere Angaben über die Lichtempfindlichkeit von *Anoptichthys jordani* machen. Danach lösen noch recht geringe Intensitäten (0,25—0,12 Lux) deutliche Reaktionen aus. Thines (1954) arbeitete bei seinen spontanen Wahlversuchen auch mit chromatischem Licht verschiedener Wellenlängen. Eine spezifische Empfindlichkeit für bestimmte Bereiche des Spektrums, wie wir eine solche von Fischen mit gut ausgebildeten Augen kennen (Wolff 1925), konnte er mit dieser Methode jedoch nicht feststellen. Zur Beurteilung von Natur und Leistung jener Rezeptoren bei den als blind bezeichneten Höhlenfischen ist es aber von Bedeutung, ob überhaupt und für welche Wellenbereiche eine spektrale Empfindlichkeit besteht. Hierfür erscheint die Dressurmethode erfolgversprechend. Mit ihr ist zunächst

\* Chargé de Recherches F. N. R. S. (Belgien).

\*\* Wir danken Herrn Prof. Dr. H. Koch und Herrn Prof. Dr. O. Kuhn herzlich für die Ermöglichung unserer Gemeinschaftsarbeit. Herrn Dr. Fr. Jochum haben wir für seinen wertvollen Anteil an der statistischen Bearbeitung zu danken.

einmal zu untersuchen, auf Strahlen welcher Wellenlängen die auf achromatisches Licht dressierten Fische ansprechen, und ob sie bei verschiedenen Wellenlängen des wirksamen Bereiches tatsächlich gleich oder verschieden empfindlich reagieren.

### B. Material und Methode

Für die Versuche wurden 15 adulte *Anoptichthys jordani* mit einer Körperlänge von 5–7 cm benutzt, die aus der Zucht des Institutes stammten. 11 Fische ließen von außen keine Augenstrukturen mehr erkennen, bei 4 Tieren waren Reste von solchen noch vorhanden. Bei keinem der Fische war eine optische Steuerung während der Futtersuche zu beobachten, auch auf heftige Bewegungen unmittelbar vor dem Aquarium reagierten sie nicht.

7 Individuen wurden einzeln in den Versuchsbecken untergebracht, während 8 Tiere sich jeweils zu zweien in einem Becken befanden. Es waren dies die Fische, die bei Dressurbeginn nur mäßig Futter aufnahmen; nach Doppelbesetzung der betreffenden Becken änderte sich das rasch. Art und Schnelligkeit der Reaktion auf Futter bzw. auf Licht wurden dadurch nicht beeinflusst: im Versuch konnte naturgemäß nur der zuerst reagierende Fisch gewertet werden; das war von den betreffenden zwei Tieren stets das gleiche Individuum.

Die Versuchsaquarien hatten eine Bodenfläche von  $40 \times 19$  cm, der Wasserstand in ihnen betrug 8 cm. Jedes Becken war mit einem Aktivkohlefilter versehen, so daß das Wasser während der Versuchsdauer nicht gewechselt werden mußte. Der Boden trug einen mattschwarzen Anstrich. Eine innen ebenfalls mattschwarze Papphaube überdeckte jedes Aquarium. In ihrer Decke befand sich eine Öffnung von  $10 \times 10$  cm, über der die Lichtquelle angebracht war. Eine weitere Öffnung von 1 cm Durchmesser erlaubte die Futtergabe, während eine an der Seite der Haube in Wasserspiegelhöhe angebrachte Öffnung von  $10 \times 5$  cm die Beobachtung der Fische ermöglichte.

Als Lichtquellen dienten 60 W-Krypton-Glühlampen der Firma Osram, die alle Licht gleicher Intensität abgaben. Die 1 cm unter der Lichtquelle angebrachte Milchglasscheibe bewirkte eine gleichmäßige Ausleuchtung der Dressurbecken. Die Glühlampen waren in Holzkästen befestigt, die je drei Fächer zur Aufnahme von verschiedenen Filterscheiben aufwiesen (Abb. 1).

Um eine Assoziation Licht = Futter bei den Fischen fest auszubilden, wurde eine Dressur in der Weise durchgeführt, daß zunächst eine geringe Quantität Futter (zerkleinerte Tubifex) mit der Pipette in das betreffende Dressurbecken gegeben und gleichzeitig das achromatische Licht eingeschaltet wurde. Sobald das Futter aufgenommen war, wurde das Licht wieder gelöscht. Mit einem Zeitabstand von mindestens 2 Stunden konnten die Fische 2–5  $\times$  am Tage ohne Verminderung der Freßlust gefüttert und belichtet werden. Nach 30 Tagen war die Dressur als gelungen zu betrachten, denn jetzt zeigten die Fische die typischen Futtersuchbewegungen auch bei einem Lichtreiz ohne Futtergabe: vor dem Lichteinschalten schwimmt das Versuchstier meist ruhig herum; nach Einschalten des Lichtes stutzt es und strebt rasch und erregt dem Boden des Beckens zu, wo es lebhaft sucht und heftig schnappt. Im weiteren Verlauf der Dressur gewöhnten sich einige Fische an, zunächst rasch zur Wasseroberfläche zu steigen und dort zu schnappen, um dann 2 bis 3 Sekunden später heftig den Boden abzusuchen. Hervorgerufen wurde dieses Verhalten offensichtlich durch

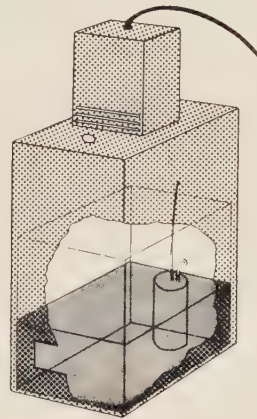


Abb. 1. Dressuraquarium mit Kohlefilter, Verdunkelungshaube und Beleuchtungskasten.

das langsame Absinken der Futterpartikel, die von den Fischen schon dicht unter der Wasseroberfläche mit Hilfe ihrer chemischen oder mechanischen Sinnesorgane wahrgenommen wurden. Der Unterschied zwischen dem normalen Schwimmen und der Reaktion auf Licht = Futter war so klar, daß die Zeit vom Einschalten des Lichtes an bis zum Beginn der Futtersuche leicht mit der Stoppuhr gemessen werden konnte. Diese Zeit bezeichnen wir als Reaktionszeit. Wir sind uns darüber klar, daß sie aus verschiedenen Komponenten besteht (Scharrer 1928), doch soll dem hier nicht weiter nachgegangen werden. Nach 4 Wochen Andressur erfolgten die Reaktionen auf achromatisches Licht sicher und immer nach nahe beieinanderliegenden Zeiten, so daß die eigentlichen Versuche mit chromatischer Strahlung begonnen werden konnten.

Für die Versuche mit verschiedenen Wellenbereichen wurden 11 chromatische Filter benutzt, und zwar drei solche der Firma Agfa und 8 Filter, die nach den Angaben von *Viaud* (1942) hergestellt und kombiniert wurden. Ihre Durchlässigkeitsbereiche und ihre prozentuale Transmission sind aus den Kurven der Abb. 2 zu ersehen; für die 3 Agfa-Filter wurden die Kurven nach den Angaben

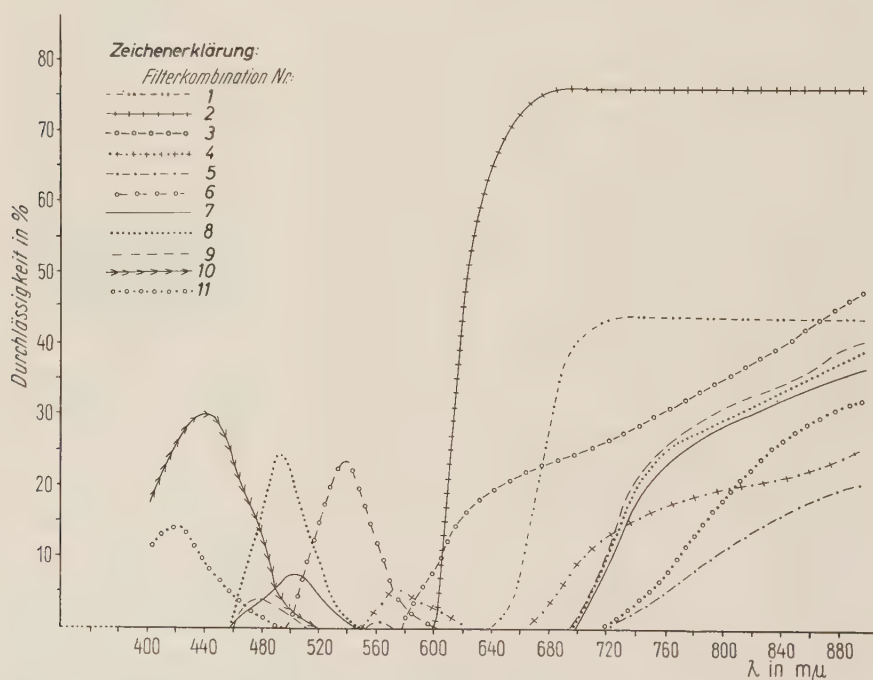


Abb. 2. Spektrale Durchlässigkeit der einzelnen Filterkombinationen in Prozent.

der Herstellerfirma eingezeichnet, für die 8 Filter nach *Viaud* sind die mit einem Beckman-Spektralphotometer festgestellten Werte dargestellt. Die *Viaud*-Filter haben einzeln keine scharf begrenzte Durchlässigkeit in den einzelnen Spektralgebieten. In bestimmten Kombinationen zu 2 bzw. 3 Filtern wird der Durchlässigkeitsbereich jedoch so eingeeengt, daß ein relativ gut begrenztes Wellengebiet ausgeschnitten wird. Außer diesen 11 chromatischen Lichtarten wurde auch das achromatische Licht der Krypton-Glühfadenbirne mit in den Versuch einbezogen. Alle Lichter wurden mit Grauscheiben energiegleich gemacht; die Energiedurchlässigkeit wurde mit einer Thermosäule (Typ Moll u. Burger Nr. E 5) kontrolliert.



Tabelle 1  
Reaktionszeiten in sec. bei verschiedenen Wellenlängen

Nr.	Filterkombination	Farbe	Durchlässigkeits- bereich	Summe d. Reak- tionszeiten (sec)
1	Orange G + Kristallviolett . . . . .	dunkelrot	> 660 m $\mu$	188,5
2	Agfa-Filter Nr. 45 . . . . .	rot	> 610 m $\mu$	168,5
3	Kongorot + Preußisch Blau . . . . .	rot	> 590 m $\mu$	162,0
4	Orange G + Lichtgrün + Preußisch Blau . . . . .	gelb	> 680 m $\mu$ / 620—550 m $\mu$	191,5
5	Orange G + Methylenblau + Preußisch Blau . . . . .	gelbgrün	> 730 m $\mu$ / 570—560 m $\mu$ keine Reaktion	
6	Agfa-Filter Nr. 54 . . . . .	grün	580—510 m $\mu$	175,5
7	Aurantia 2 + Brillantgrün + Preußisch Blau . . . . .	grünblau	> 710 m $\mu$ / 540—470 m $\mu$	175,0
8	Brillantgrün + Lichtgrün + Preußisch Blau . . . . .	grünblau	> 710 m $\mu$ / 530—460 m $\mu$	157,5
9	Brillantgrün + Methylviolett + Preußisch Blau . . . . .	blau	> 710 m $\mu$ / 500—460 m $\mu$	162,5
10	Agfa-Filter Nr. 552 . . . . .	blau	500—400 m $\mu$	175,5
11	Methylviolett + Methylenblau + Preußisch Blau . . . . .	blauviolett	> 740 m $\mu$ / 470—400 m $\mu$	178,5
12	Achromatisches Licht . . . . .			148,5

Die Lichtquellen konnten durch einen Serienschalter nacheinander lautlos und für die Versuchsanordnung erschütterungsfrei ein- und ausgeschaltet werden; eine Fehldressur auf andere Reize als das Licht wurde so ausgeschlossen.

Sämtliche Becken standen auf einem Regal in einer durch eine Rotbirne nur schwach beleuchteten Dunkelkammer. Die Raumtemperatur betrug konstant  $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ .

### C. Die Versuche

Wenn die Fische nach Dressur auf achromatisches Licht eindeutige Reaktionen zeigten, wurden sie in den Versuch genommen. Wie bei der Andressur wurde nun jeder Fisch mit jeder der 12 Lichtarten angestrahlt, die Zeit bis zum Eintreten der Suchbewegungen mit der Stoppuhr gemessen und nach Belohnung mit Futter abgeschaltet. Bei jedem Versuchstier wurde 5 mal nacheinander mit Abständen von mindestens 2 Stunden das gleiche chromatische Licht gegeben.

In den Beobachtungsreihen traten neben den nahe beieinanderliegenden Einzelwerten anscheinend regellos und nicht häufig sehr lange Reaktionszeiten auf. So reagierte das Tier A 10 bei 5 nacheinander durchgeführten Versuchen wie folgt: 3 sec; 3,5 sec; 3,5 sec; 12 sec; 2,5 sec. Während der Fisch bei Einschalten des Lichtes sonst in Bewegung angetroffen wurde, stand er einmal vollkommen ruhig im Wasser und erst nach 12 sec setzte die Reaktion schlagartig ein. Es muß angenommen werden, daß das Tier sich in einem physiologischen Ruhezustand befand, den man vielleicht als „Schlaf“ bezeichnen könnte. *Breder* und *Gresser* (1941) geben zwar für *Anoptichthys jordani* an, daß die Fische sich ständig Tag und Nacht in Bewegung befinden. Das gleiche konnten wir in den Aquarien feststellen, wo die Fische im Schwarm gehalten werden und sich dauernd gegenseitig stören. Wie aber das Beispiel zeigt, dürfte es auch für *Anoptichthys* Ruhezustände geben, bei denen eine Reaktion auf äußere Reize nicht so schnell erfolgt wie im aktiven Zustand.

Nicht immer sind die Unterschiede bei den Reaktionszeiten derart groß, wie das Beispiel einer Beobachtungsreihe von A 9 zeigt: 5,5 sec; 3 sec; 3 sec; 3 sec und 2,5 sec. So ist es im Einzelfall nicht leicht zu entscheiden, ob eine etwas verlängerte Reaktionszeit auf ein Inaktivitätsstadium oder auf eine verschiedenartige Wirkung der betreffenden Filterkombination oder auf andere Faktoren zurückzuführen ist.

Für jede der 12 Lichtarten ist die Summe der Reaktionszeiten bei 11 Fischen und je 5 Wiederholungen in Tabelle 1 angegeben.

**Ergebnis:** Ein erster wichtiger Befund besteht in der Feststellung, daß, obwohl bei jeder Lichtart ein Reiz gleicher Energie gesetzt wird, die Fische nicht in gleicher Weise reagieren.

Hieraus ergibt sich, daß *Anoptichthys* für die Wellenlängen oberhalb  $400\text{ m}\mu$  verschieden empfindlich ist.

Ein zweiter Befund ist das Ausbleiben der Reaktion bei Filter Nr. 5: der weit überwiegende Anteil der Strahlen dieses Filters hat Wellenlängen oberhalb  $730\text{ m}\mu$ . Das heißt also, daß ultrarote Strahlen bei *Anoptichthys* kein Lichtempfinden hervorrufen; die Wahrnehmungsgrenze liegt ganz sicher unterhalb  $730\text{ m}\mu$ . Die geringe Energiemenge, die im Bereich von  $560\text{--}570\text{ m}\mu$  dieses Filter passiert, liegt demnach unterhalb der Reizschwelle. Eine Reaktion wurde auch nach verhältnismäßig langer Bestrahlung — bis zu 2 Minuten — nie erreicht. Der zu einer Lichtreaktion

führende Wellenbereich erstreckt sich also bei Anoptichthys auf einen auch für unser menschliches Auge sichtbaren Teil des Spektrums.

Es ist nun zu prüfen, ob Anoptichthys innerhalb des Lichtreaktionen auslösenden Teiles des Spektrums für alle Wellenlängen gleich oder verschieden empfindlich ist. Innerhalb des wirksamen Bereiches sind die von den Filtern hindurchgelassenen Energiemengen

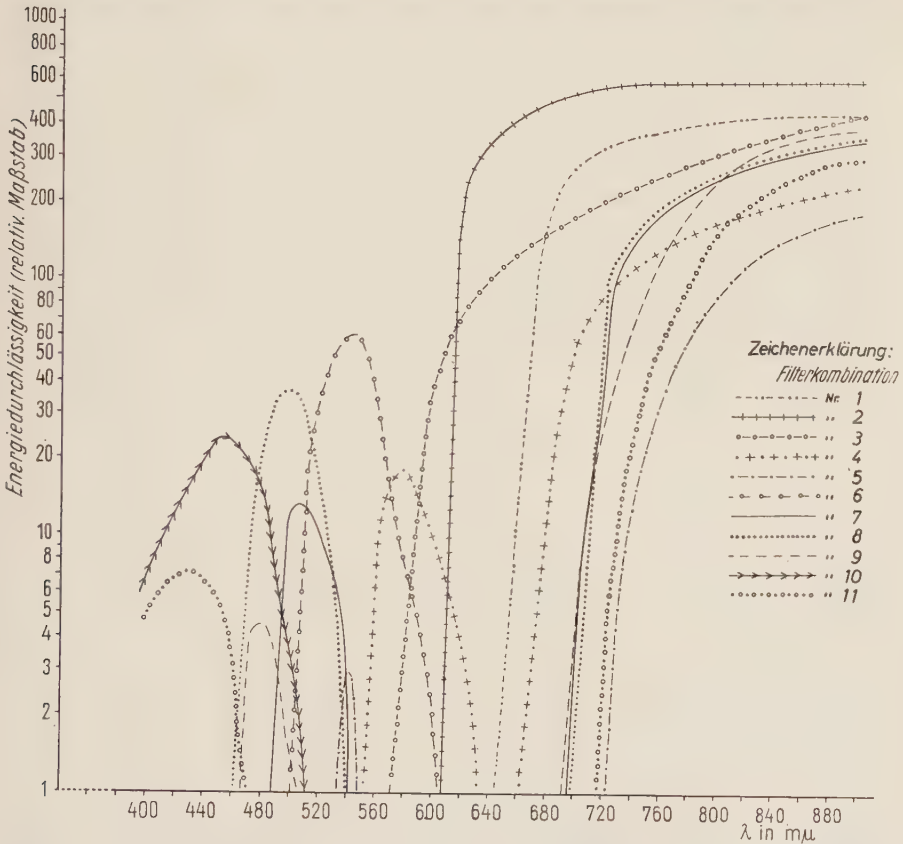


Abb. 3. Spektrale Energieverteilung der einzelnen Filterkombinationen in relativem Maßstab. Es ist zu beachten, daß die Kurve für die Durchlässigkeit bei Filterkombination 5, die bei 720 mμ endet, bei ca. 560 mμ nur eine geringfügige Fortsetzung hat; ähnlich liegen die Verhältnisse bei Filterkombination 9 usw.

nicht mehr gleich. Abb. 3 zeigt die spektrale Energieverteilung für die einzelnen Filter; die Kurven wurden an Hand der spektralen Energieverteilung der 60 W-Krypton-Glühfadenbirne und der mit dem Photometer festgestellten spektralen Transmission der Filter bestimmt.

Ergebnis: Wie eine Gegenüberstellung der in Abb. 3 dargestellten Energiemengen mit den entsprechenden Reaktionszeiten (Tab. 1) zeigt, besteht kein Zusammenhang lediglich zwischen Energiemenge und Reaktionszeit. Das würde also bedeuten: auch innerhalb des sichtbaren Spektralgebietes ist Anoptichthys nicht für alle Wellenlängen in gleichem Grade empfindlich. Der Einfluß der Wellen-



länge muß sich mit den vorliegenden Befunden da aufzeigen lassen, wo beim Vergleich zweier Filter die Reaktionszeiten mit Sicherheit in einem umgekehrten Verhältnis zu den durchgelassenen Energiemengen stehen.

Nun sind allerdings die Reaktionszeiten nicht ausschließlich durch die Wirkung der Filter auf gleichartige Versuchsobjekte bedingt, sondern können von Faktoren beeinflusst werden, die in den Versuchstieren selbst liegen. So ist zunächst an Verschiedenheiten der angeborenen individuellen Reaktionsvermögen, dann aber auch an die jeweilige physiologische Stimmung, an die Reaktionsbereitschaft zu denken. In Erwägung zu ziehen wäre ferner, daß die Fische während der Versuchsdurchführung durch die verschiedenen Filter in entsprechend verschiedener Weise weiter dressiert wurden und zunehmend empfindlicher reagierten. Da mit dem Filter Nr. 5 niemals eine Reaktion erzielt werden konnte, läßt es die Versuchsplanung zu, die Gesamtvarianz in ihre Teilvarianzen aufzugliedern und eine Differenz mit Sicherheit anzugeben, die der unterschiedlichen Wirkung der Filter zugeschrieben werden muß. Die Ergebnisse einer solchen Varianzanalyse sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2

**Nachweis signifikanter Unterschiede in den Reaktionszeiten durch  
Varianzanalyse**

Art d. Varianz	Q. S.	F. G.	M. Q. S.	F.	F. (P = 0,05)
<b>Hauptvarianzen</b>					
Farben . . . . .	30,66694	10	3,066694	2,3374	1,85
Fische . . . . .	274,61234	10	27,461234	20,9308	1,85
Wiederholungen . . .	13,01075	4	3,25269	2,4792	2,39
<b>Zwischenvarianzen</b>					
Farben × Fische . . .	193,21494	100	1,932149	1,4726	1,28
Wiederholungen × Fische . . . . .	66,00759	40	1,650189	1,2578	1,42
Farben × Wieder- holungen . . . . .	44,18016	40	1,104504	—	—
Fehler . . . . .	524,80150	400	1,3120036	—	—
Total . . . . .	1146,494220	604			

Nicht in Rechnung gesetzt werden konnten die bereits erwähnten mehr oder weniger langen Ruhezustände, also die hierdurch verminderte Reaktionsbereitschaft. Aus diesem Grunde wurde als Grenzwahrscheinlichkeit  $P = 0,05$  gewählt.

Es ist nun zu untersuchen, ob diese signifikanten Reaktionsunterschiede durch gleichsinnig verschiedene Energiezufuhr erklärt werden können. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die langwelligen Strahlen oberhalb von  $730\text{ m}\mu$  sicher unwirksam sind. Den verschiedenen Reaktionszeiten durch Filter Nr. 1 und Nr. 3 entsprächen dann etwa gleiche Energiemengen. Da Filter Nr. 3 einen erheblichen Energieanteil mit kürzeren Wellenlängen passieren läßt als Filter Nr. 1, besagt das, daß die Empfindlichkeit

der Anoptichthys für Strahlen von 600 nach 700  $m\mu$  stark abnimmt. Dem entspricht auch die Wirkung des Filters Nr. 2; gegenüber Filter Nr. 3 besitzt es einen geringeren Anteil der wirksameren kürzeren Wellenlängen, läßt aber bis 730  $m\mu$  sehr erheblich mehr Energie passieren und erreicht dennoch nicht ganz dieselbe kurze Reaktionszeit. Es steht also außer Zweifel, daß die Empfindlichkeit mit längerwelligem Rotlicht stark abnimmt. Ein Vergleich der mit diesen drei Filtern zugeführten Energien mit den ihnen entsprechenden Reaktionszeiten dürfte zudem darauf hindeuten, daß die Wahrnehmungsgrenze noch unterhalb von 730  $m\mu$  etwa bei 690 bis 700  $m\mu$  liegt.

Die signifikant längeren Reaktionszeiten bei Filter Nr. 4 gegenüber Nr. 2 und Nr. 3 könnte man auf die geringere Energiedurchlässigkeit zurückführen. Dies geht aber sicher nicht mehr bei dem Vergleich mit Filter Nr. 9. Bei diesem Filter ist trotz erheblich geringerer Energiezufuhr die Reaktionszeit in signifikanter Weise wesentlich kürzer. Das heißt also, daß Anoptichthys auf Strahlen der Wellenlänge von etwa 490  $m\mu$  sicher empfindlicher reagiert als auf solche von 580  $m\mu$  und längeren. Letzteres ist in Anbetracht der nicht signifikant verschiedenen kurzen Reaktionszeiten gegenüber dem energiereicheren Filter Nr. 1 mit seiner längeren Reaktionszeit evident.

Auffallend sind die sehr kurzen Reaktionszeiten bei achromatischem Licht. Leider war es technisch nicht durchführbar, die spektrale Absorptionskurve des hier verwendeten starken Graufilters mit dem Beckman-Photometer zu bestimmen, so daß ein Energievergleich im Bereich von 400—700  $m\mu$  mit den anderen Filtern nicht möglich ist. Es dürfte aber kaum ein Zweifel darüber bestehen, daß hier die Summe aller überhaupt wirksamen Wellenlängen zur Geltung kommt und die kurze Reaktionszeit bedingt.

**Ergebnis:** Die Experimente zeigen also, daß Anoptichthys jordanii nicht für Strahlen aller Wellenlängen gleich empfindlich ist. Die längste noch wirksame Wellenlänge liegt sicher unterhalb von 730  $m\mu$  und dürfte praktisch mit 690—700  $m\mu$  erreicht sein. Ultrarote Strahlen werden nicht wahrgenommen. Innerhalb des Wellenlängenbereiches von 400—700  $m\mu$  besteht ein Empfindlichkeitsmaximum bei etwa 490  $m\mu$ . Von 580—700  $m\mu$  nimmt die Empfindlichkeit stark ab.

#### D. Besprechung der Ergebnisse.

##### 1. Die Rezeption von Licht.

Trotz weitgehender Degeneration der Augen vermag Anoptichthys Lichtreize zu rezipieren — und zwar bemerkenswerterweise im wesentlichen innerhalb des Spektralbereichs, den auch Fische mit gut entwickelten Augen wahrnehmen. Kühn (1923), Schiemenz (1924) und Wolff (1925) wiesen für die Elritze nach, daß ihr Farbenwahrnehmungsbereich dem des menschlichen Auges mit ungefähr der gleichen Grenze im langwelligen Teil des Spektrums sehr ähnlich ist. Im kurzwelligen Gebiet kann die Elritze noch bis

zu einer Wellenlänge von  $340\text{ m}\mu$  wahrnehmen. Anoptichthys spricht im langwelligen Gebiet noch sicher auf  $660\text{ m}\mu$  an. Im kurzwelligen Gebiet konnte nur bis zu einer Wellenlänge von  $400\text{ m}\mu$  geprüft werden, wobei in jedem Falle Reaktionen zu verzeichnen waren. Es ist durchaus möglich, daß hier die untere Grenze noch nicht erreicht ist.

## 2. Empfindlichkeitsunterschiede.

### a) bei verschiedenen Wellenlängen.

Die Empfindlichkeit für chromatisches Licht aus dem Gebiet des sichtbaren Spektrums ist nicht überall gleich. Im langwelligen Rot sind die Reaktionszeiten verlängert. Oberhalb von  $600\text{ m}\mu$  ist die Empfindlichkeit zumindest herabgesetzt. Bei  $700\text{ m}\mu$  ist wohl die obere Grenze für das Rezeptionsvermögen nahezu erreicht; sie liegt also dem Anschein nach etwas niedriger als zum Beispiel bei der Elritze (*Schiemanz* 1924 u. *Wolff* 1925). Ein Maximum der Empfindlichkeit besteht für Anoptichthys bei ungefähr  $490\text{ m}\mu$ . Nach *Wolff* (1925) hat die Elritze ein besonders gut ausgebildetes Farbenunterscheidungsvermögen unter anderem auch bei  $490\text{ m}\mu$  gegenüber den benachbarten Wellenlängen.

Dieses Maximum unserer ständig dunkeladaptierten Anoptichthys ist dem bei vielen Vertebraten bestimmten Empfindlichkeitsmaximum im Dämmerungssehen sehr ähnlich und entspricht auch annähernd dem Absorptionsmaximum des Sehpurpurs, das für manche Fische bei  $500\text{ m}\mu$  liegt. Doch gerade bei Fischen kommen hier stärkere Abweichungen vor; wie diese Verhältnisse bei den Characiden und besonders bei *Astyanax mexicanus*, von dem Anoptichthys phylogenetisch abgeleitet wird, liegen, ist nicht bekannt.

### b) bei verschiedener Strahlungsintensität.

Die Reaktionszeit hängt auch von der Strahlungsintensität ab, wie für achromatisches Licht von *Kuhn* u. *Kähling* (1954) bei jungen Tieren nachgewiesen wurde und für adulte Tiere wahrscheinlich gemacht werden konnte. Auch *Thines* (1954) findet, daß sowohl die Höhlenbarbe *Caecobarbus geertsii* Blgr. als auch Anoptichthys jordanii Hubbs u. Innes auf Intensitätsunterschiede ansprechen. In unseren Versuchen zeigt sich dies besonders bei Filter Nr. 5, bei dem in einem durchaus wirksamen Wellenlängenbereich wegen der zu geringen Intensität keine Reaktion ausgelöst werden konnte.

### c) Der Einfluß von Wellenlänge und Strahlungsintensität.

In jedem Falle wirken sich sowohl Wellenlänge als auch Intensität auf die Reaktionszeit aus. Der signifikante Unterschied zwischen der Wirkung des Bereichs um  $490\text{ m}\mu$  und der des Gebietes von  $550\text{--}620\text{ m}\mu$  ist bei annähernd gleicher Intensität sicher auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Fische innerhalb eines bestimmten Spek-



tralgebietes zurückzuführen. Andererseits dürften die kurzen Reaktionszeiten bei den Filtern Nr. 2 und 3 trotz der hier verminderten Empfindlichkeit auf der großen Intensität des Lichtes beruhen.

### 3. Der Ort der Lichtrezeption

Da *Anoptichthys* für gewisse Wellenlängen in verschiedenem Grade lichtempfindlich ist, könnte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß die rudimentären Augen maßgeblich an der Lichtrezeption beteiligt sind. Wenn auch der Grad ihrer Rückbildung bei den einzelnen Individuen unterschiedlich ist, so kann doch stets eine wesentliche Verkleinerung des Augenbulbus, eine weitgehende Degeneration der Linse oder sogar ihr völliges Verschwinden und ein Fehlen der Pupillenöffnung konstatiert werden (Gresser u. Breder 1940; Lüling 1953, 1955; Kuhn u. Kähling 1954). Auch die Retina ist bei den adulten Tieren weitgehend abgebaut, so daß die Schicht der Stäbchen und Zapfen verödet ist und in den Körnerschichten große Lücken auftreten. Nach all dem kann kaum angenommen werden, daß die Augen noch Licht rezipieren können.

Daß Fische aber auch ohne Augen lichtempfindlich sind, wiesen von Frisch (1911) und Scharrer (1928) bei geblendeten Elritzen nach. Scharrer konnte zeigen, daß noch sehr geringe Intensitäten achromatischen Lichtes wahrgenommen werden, während bei chromatischem Licht verschiedener Wellenlängen das für das menschliche Auge hellste Licht auch die größte Wirkung auf die Tiere hatte. Als Ort der Lichtempfindlichkeit wurde das Zwischenhirn — besonders die Epiphyse und angrenzende Gebiete — nachgewiesen. Breder u. Rasquin (1947) kommen zu der Annahme, daß auch bei *Anoptichthys* die Epiphyse — allerdings im Zusammenwirken mit den rudimentären Augen — eine Rolle bei der Lichtrezeption spielen müsse.

Wenn sich bei unseren Experimenten mit *Anoptichthys jordani* erwiesen hat, daß diese Fische in bestimmten Spektralgebieten unterschiedlich gut rezipieren, so kann also aus dieser Feststellung nicht ohne weiteres auf eine Beteiligung der Augen geschlossen werden. Z. Z. laufende Untersuchungen machen es wahrscheinlich, daß den Augenrudimenten keine Bedeutung als Rezeptoren für Licht verschiedener Wellenlängen zuzumessen ist.

Es besteht die Möglichkeit, daß auch hier das Gebiet des Zwischenhirns für diese Strahlung eine erhöhte Empfindlichkeit aufweist. Die anatomisch-histologischen Voraussetzungen hierzu sind denen bei der Elritze (Scharrer 1928) ähnlich (Breders u. Rasquin 1947). Eine funktionelle Analyse wird mit Hilfe einer speziellen elektro-physiologischen Methodik z. Z. bei uns vorgenommen.

Als weiterer möglicher Rezeptionsort käme ein Hautlichtsinn in Betracht. Breder (1944) gibt an, daß er bei den meisten Fischen nicht vorhanden sei; doch müßte das für *Anoptichthys* noch nachgeprüft werden.

Über den Ort der Lichtempfindlichkeit kann und soll demnach in dieser Untersuchung noch nichts Endgültiges ausgesagt werden.

## Zusammenfassung

Adulte Höhlenfische der Art *Anoptichthys jordani* Hubbs u. Innes (Characidae) mit weitgehend rückgebildeten Augen wurden auf achromatisches Licht dressiert. Nach 4 Wochen erfolgen die typischen Futtersuchreaktionen sicher und schnell.

Diese Reaktion kann auch mit chromatischen Lichtern verschiedener Wellenlängen in jedem Gebiet zwischen 700 und 400 m $\mu$  ausgelöst werden, sofern die Strahlung die nötige Intensität hat.

Bei ultraroter Strahlung erfolgt keine Reaktion.

Oberhalb der Wellenlänge von etwa 600 m $\mu$  nimmt die Empfindlichkeit bis zur Wellenlänge von etwa 690—700 m $\mu$  stark ab; sie ist hier praktisch, bei 730 m $\mu$  sicher nicht mehr vorhanden.

Ein Empfindlichkeitsmaximum hat *Anoptichthys* bei 490 m $\mu$ : hier erfolgt eine schnellere Reaktion als etwa bei 550—620 m $\mu$ .

## Summary

In spite of the rudimentary character of its eye-remnants, the cave fish *Anoptichthys jordani* still displays a definite light sensitivity, which determines a differential response to various specific wavelengths, with a maximum at 490 m $\mu$ . The sensitivity is less marked in the region of 550—620 m $\mu$  and diminishes considerably as one approaches the long wavelengths of red; above 730 m $\mu$ , it seems to disappear completely.

## Résumé

Bien qu'il ne possède plus que de rudiments oculaires, le poisson cavernicole *Anoptichthys jordani* manifeste encore une certaine photosensibilité. Celle-ci se présente sous la forme d'une réponse différentielle à des longueurs d'onde déterminées, avec un maximum à 490 m $\mu$ . La réponse est moins nette dans la bande des 550—620 m $\mu$  et diminue de façon marquée à mesure que l'on pénètre plus avant dans les longueurs d'onde du rouge. Elle semble disparaître totalement au-delà de 730 m $\mu$ .

## Schrifttum

- Breder, C. M. jr., Zoologica, New York, 29 (1944): 131 — Breder, C. M. jr. u. E. B. Gresser, Zoologica, New York, 26 (1941): 123 — Breder, C. M., jr., u. P. Rasquin, Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 89 (1947): 323 — Daumer, K., Zschr. vergl. Physiol. 38 (1956): 413 — Frisch, K. von, Arch. Physiol. 138 (1911): 319 — ders., Zschr. vergl. Physiol. 2 (1925): 393 — Gresser, E. B. u. C. M. Breder, Zoologica, New York, 25 (1940): 113 — Hubbs, C. L. u. W. T. Innes, Occas. Papers Mus. Zool. Univ. Michigan, 342 (1936): 1 — Kühn, A., Nachr. Ges. Wiss. Göttingen Math.-nat. Kl. 1—6, 1923 — Kuhn, O. u. J. Kähling, Experientia 10 (1954): 385 — Lüling, K. H., Zool. Anz. 151 (1953): 289 — ders., Zool. Jb. (Abt. Allg. Zool. u. Physiol.) 65 (1954): 9 — ders., Zool. Jb. (Abt. Anat. u. Ontog. d. Tiere) 74 (1955): 401 — Scharrer, E., Zschr. vergl. Physiol. 7 (1928): 1 — Schiemenz, F., Zschr. vergl. Physiol. 1 (1924): 175 — Thines, G., Ann. Soc. Zool. Belgique 84 (1953): 231 — ders., Ann. Soc. Zool. Belgique 85 (1954): 35 — Viaud, G., Compt. rend. Soc. Phys. Biol. France 16 (1942): 1 — Wolff, H., Zschr. vergl. Physiol. 3 (1925): 279



**Beiträge:** Zur Veröffentlichung kommen nur Originalarbeiten und wissenschaftliche Kurzmitteilungen; Buchbesprechungen werden *nicht* aufgenommen. Die Originalarbeiten sollen möglichst 3 Druckbogen und die wissenschaftlichen Kurzmitteilungen 2 Druckseiten nicht überschreiten. Jede Arbeit soll am Schluß eine kurze Zusammenfassung enthalten. — Schrifttumangaben sind jeweils an den Schluß der Arbeit zu setzen und zwar einheitlich wie folgt: Nachname des Verfassers, Anfangsbuchstabe des Vornamens, Zeitschrift, **Band**, Jahreszahl, Seite. Bei Schrifttumangaben von Büchern folgen auf den Verfassernamen der Titel des Buches, Auflage, Ort, Jahreszahl, Seite.

Die Niederschriften sind möglichst einseitig mit Schreibmaschine zu schreiben. Beigefügte Abbildungen, graphische Darstellungen und Tabellen sollen auf der Rückseite den Namen des Verfassers und der Arbeit aufweisen. Als Vorlagen für die Abbildungen sind unmittelbar wiedergabefähige, also durchaus saubere Zeichnungen oder scharfe photographische Abzüge erwünscht. Sofern Neuzeichnungen nach den übersandten Vorlagen notwendig sind, erfolgen sie auf Kosten des Verfassers. — Die Beigabe von Tabellen soll wegen der hohen Satzkosten möglichst eingeschränkt werden; höhere Kosten werden dem Verfasser berechnet.

**Unkosten-Entschädigung:** Die Entschädigung für die Aufwendungen des Verfassers beträgt DM 24.— je Druckbogen. Mehr als 3 Druckbogen je Arbeit werden nicht honoriert.

**Sonderdrucke:** Die Verfasser erhalten 40 Sonderdrucke unberechnet. An Stelle der Unkosten-Entschädigung ist auch die Lieferung von weiteren Sonderdrucken (bis zu 60) möglich, sofern ihre Bestellung bei Rücksendung der Korrektur erfolgt. Mehr als insgesamt 100 Sonderdrucke können nicht angefertigt werden.

Alle Rechte, auch die des Nachdruckes, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, behalten sich Urheber und Verleger vor. Es ist insbesondere nicht gestattet, ohne Genehmigung des Verlages dieses Heft, einzelne Beiträge oder Teile daraus auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

*Neu!*

## Wandlungen in der Medizin

Gedanken zu einer Ganzheitsmedizin

Von Prof. Dr. K. KÖTSCHAU,  
Bad Harzburg

230 Seiten. 1956. Ganzleinen DM 17.—



URBAN & SCHWARZENBERG  
MÜNCHEN · BERLIN · WIEN



Urban & Schwarzenberg  
München · Berlin · Wien

*Wir bieten an aus den Gebieten*

### **Anatomie und Entwicklungsgeschichte:**

**Polarisationsoptische Analyse des submikroskopischen Baues von Zellen und Geweben.** Von W. J. Schmidt. Mit 149 Abb. 232 Seiten (= Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden, Lfg. 429) DM 13.50

**Methoden der vergleichenden morphologischen Forschung.** Von E. Ackerknecht, H. Baum, J. U. Duerst . . . Mit 761 Abb. und 6 Tafeln. 1807 Seiten (= Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden, Abt. VII, Teil 1 und 2) DM 99.25

**Vergleichende Untersuchungsmethoden am Skelett bei Säugern.** Von J. U. Duerst. Mit 227 Abb. 406 Seiten (= Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden, Lfg. 200) DM 19.80

**Technik der Haar- und Wolluntersuchung.** Von C. Kronacher und G. Lodemann. Mit 214 Abb. 426 Seiten (= Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden, Lfg. 316) DM 30.00

**Die präparatorisch-anatomischen Methoden beim Menschen.** Von R. Heiss. Mit 2 Abb. 238 Seiten (= Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden, Lfg. 476) DM 14.20

**Konservierung von Organen und ganzen Organismen.** Von G. Schmeidel.-  
**Anthropologische Messungen am lebenden Menschen.** Von R. H. Post. 96 Seiten (= Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden, Lfg. 362) DM 4.80

**Spezielle Methoden anthropologischer Messung.** Von Th. Mollison. Mit 183 Abb. 160 Seiten (= Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden, Lfg. 468) DM 9.00

**Zoologisch-mikroskopische Technik** mit Einschluß der embryologischen Technik. Von W. A. Collier. 463 Seiten (= Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden, Lfg. 297) DM 24.00

**Methoden der Vererbungsforschung.** Von J. Bauer, F. G. Brieger, H. Federley . . . Mit 254 Abb., 3 farbigen Tafeln, 3 Satztafeln und 2 Beilagen. 1402 Seiten (= Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden, Abt. IX, Teil 3, 1. und 2. Hälfte) DM 70.95

**Die Methoden der phylogenetischen (stammesgeschichtlichen) Forschung.** Von H. H. Karny. Mit 40 Abb. 290 Seiten (= Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden, Lfg. 177) DM 12.60